

**Neuer Funktionstest zur Qualitätssicherung  
transfundierter Plättchen (PLT) aus  
Thrombozyt-Apherese-Konzentraten (TAK)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät**

**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Matthias Groh**

**geboren am 06. März 1982 in Zwickau**

## Gutachter

1. Frau Prof. Dr. D. Barz, Jena
2. Prof. Dr. A. Hochhaus, Jena
3. Prof. Dr. Th. Eiermann, Hamburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. Juli 2011

---

## Verwendete Abkürzungen und Bezeichnungen

AA	Aplastische Anämie
Abb	Abbildung
ACD-A	Acid-Citrat-Dextrose, Lösung A (Citrat)
ADP	Adenosindiphosphat
AI	Adhäsionsindex
AK	Antikörper
ALG	Antilymphozyten-Globulin
AP	Apherese bzw. Thrombozytapherese
ATG	Antithymozyten-Globulin
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Buffy coat
BC-TK	gepooltes Thrombozytenkonzentrat aus Buffy Coats
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
CCI	Corrected Count Increment (korrigiertes Inkrement)
CD	Cluster of Differentiation
CPA	Cone Platelet Assay
CPD	Citrate-Phosphate-Dextrose (Citrat)
CSA	Clot Signature Analyzer
CTL	Zytotoxische T-Zellen
Dyn	1 dyn = 1 g x cm/s <sup>2</sup> ; 10 <sup>5</sup> dyn = 1 N (Newton)
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
ESC	Extent Shape Change
FDA	Food and Drug Administration
GP	Glykoprotein
GvHR oder GvHK	Graft versus Host Reaktion oder Graft versus Host Krankheit
GvL oder GvM	Graft versus Leukämie oder Graft versus Malignität (engl. graft versus leukemia/malignancy)
HB	Hepatitis B

---

HCV	Hepatitis C-Virus
HD	hämorrhagischer Diathese
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HK	Hämatokrit
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSR	hypotone Schockresistenz
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
LIBS	Liganden-induzierte Bindungsstellen
KMT	Knochenmarktransplantation
Max	Maximum
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Min	Minimum
MPV	mittleres Plättchenvolumen
MW	Mittelwert
Pa s	Pascalsekunde, $1 \text{ Pa s} = 1 \text{ N s/m}^2$
PADA	Platelet ADhesion Assay
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PFA	Platelet Function Assay
P-LCR	Platelet-Large Cell Ratio
PLT	Platelet (Blutplättchen)
PP	Pasteur Pipette
PRP	plättchenreiches Plasma
RBC	Red Blood Cell (Erythrozyten)
RES	retikuloendotheliales System
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RIBS	Rezeptor-induzierte Bindungsstellen
RKI	Robert-Koch-Institut
RPFA	Rapid Platelet Function Assay
RR	Reagenzröhrchen
SCS	Surface Connecting System
SD	Standardabweichung
SFMW	Standardfehler des Mittelwertes

---

SZ	Stammzellen
Tab	Tabelle
TAK	Thrombozyt(en)-Apherese-Konzentrat
TAK-PLT	Thrombozyt(en)-Apherese-Konzentrat-Plättchen
TF	Transfusion
TK	Thrombozytenkonzentrat
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAP-6	Thrombin-Receptor Activating Peptide 6 (Thrombinrezeptoraktivierendes Peptid 6)
UKJ	Universitätsklinikum Jena
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBC	White Blood Cell (weißes Blutkörperchen)
ZF	Zentrifugation

## Maßeinheiten

g	Gramm bzw. Fallbeschleunigung
Gy	Gray
l	Liter
m	Meter
h	Stunde
Min	Minute
RPM	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)

## Präfixe

c	Zenti
f	Femto
k	Kilo
$\mu$	Mikro
m	Milli
n	Nano

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Allgemeines	3
2.2	Die Morphologie und Physiologie von Thrombozyten	3
2.2.1	Übersicht	3
2.2.2	Morphologie	4
2.2.3	Membranglykoproteine	5
2.3	Hämostase	8
2.3.1	Allgemeines	8
2.3.2	Plättchenaktivierung durch Scherstress	9
2.3.3	Funktionsstadien von Thrombozyten	10
2.3.3.1	Adhäsion	10
2.3.3.2	Aggregation	14
2.4	Funktionsdiagnostik der Thrombozyten	14
2.5	Thrombozytopathie und Thrombozytopenie als Ursachen hämorrhagischer Diathese	15
2.5.1	Thrombozytopathie	15
2.5.2	Thrombozytopenie	17
2.6	Periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT)	19
2.6.1	Allgemeines	19
2.6.2	Gewinnung von peripheren Blutstammzellen	19
2.6.3	Spenderauswahl und Transplantation	20
2.6.4	Zytostatika und Aplasiephase, sowie Blutbildung (Hämatopoese)	21
2.6.5	Auszug zur speziellen Immunsuppression mit Antithymozyten-Globulin (ATG) bzw. Antilymphozyten-Globulin (ALG)	22
2.6.6	Komplikation versus Vorteil einer allogenen PBSZT	24
2.6.7	Indikation der PBSZT	24
2.7	Thrombozytentransfusion bei hämatologisch-onkologischen Patienten	25
2.7.1	Allgemeines	25

2.7.2	Spezielle Indikationen für Patienten mit akuter Thrombozytenbildungsstörung nach Hochdosismotherapie im Kontext einer Stammzelltransplantation	29
2.8	Produktion, Lagerung und Qualitätssicherung von TK	29
2.8.1	Produktion und Lagerung	29
2.8.2	Bestrahlung von TK zur Prophylaxe der Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR)	30
2.8.3	Qualitätssicherung und Bestimmungen	32
2.8.3.1	Qualitätssicherung von TAK	32
2.8.3.2	Qualitätssicherung bestrahlter TK	34
2.8.3.3	Qualitätssicherung der TK-Transfusion (TF)	34
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>38</b>
4.1	Materialien	38
4.1.1	Geräte und Beutelsysteme	38
4.1.2	Reagenzien	38
4.2	Methoden	39
4.2.1	Allgemeines Testprinzip des „Platelet ADhesion Assay“ (PADA) (HaemoSys GmbH Jena)	39
4.2.2	PLT-Membranglykoprotein und Aktivierungsmarker CD62P	40
4.3	Methodenvalidierung des PADA für die Untersuchungen der TAK-PLT <i>nach</i> TF	41
4.4	Daten- und Probengewinnung der TAK-PLT <i>vor</i> und <i>nach</i> TF	42
4.4.1	Allgemeines	42
4.4.2	TAK-PLT <i>vor</i> TF	43
4.4.2.1	Herstellung der TAK	43
4.4.2.2	TAK-Daten <i>vor</i> TF	43
4.4.2.3	Probenentnahme der TAK-PLT <i>vor</i> TF	43
4.4.3	TAK-PLT <i>nach</i> TF (Patientenrekrutierung und Probengewinnung)	44
4.4.3.1	Grundlagen der Datenerhebung	44
4.4.3.2	Messdaten <i>nach</i> TF (PLT- und Patientendaten)	45
4.4.3.3	Probenentnahme der TAK-PLT <i>nach</i> TF	46
4.5	Testdurchführung mittels PADA	47
4.5.1	Untersuchung der TAK-PLT <i>vor</i> TF mittels PADA	47
4.5.2	Untersuchung der TAK-PLT <i>nach</i> TF mittels PADA	47

---

4.6	Statistik	48
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
5.1	Allgemeines	49
5.2	Darstellung der Validierung des PADA für die Untersuchungen <i>nach</i> TF	49
5.3	Charakteristik und Qualitätsparameter der (transfunden) TAK	51
5.4	Adhäsionsindex (AI) und CD62P der TAK-PLT <i>vor</i> TF	52
5.4.1	Darstellung von Adhäsionsindex (AI) der TAK-PLT <i>vor</i> TF	52
5.4.2	Darstellung von CD62P der TAK-PLT <i>vor</i> TF	54
5.5	Darstellung des Adhäsionsindex (AI) , CD62P, CCI und der Recovery der TAK-PLT <i>nach</i> TF	56
5.5.1	Darstellung von Adhäsionsindex (AI) der TAK-PLT <i>nach</i> TF	56
5.5.2	Darstellung von CD62P der TAK-PLT <i>nach</i> TF	57
5.5.3	Darstellung von CD62P der TAK-PLT <i>vor</i> TF (US) gegenüber CD62P der TAK-PLT <i>nach</i> TF (US)	59
5.5.4	Darstellung des CCI und der Recovery 1 Stunde <i>nach</i> TF als derzeitigen Standard zur Beurteilung der Wirksamkeit von TAK-PLT <i>nach</i> TF	60
5.6	Diagrammübersichten	62
5.7	Untersuchung von möglichen Einflussfaktoren auf den AI der PLT <i>nach</i> TF	65
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
6.1	Allgemeines	66
6.2	Aktuelle Qualitätsbestimmungsmethoden von PLT <i>vor</i> und <i>nach</i> TF	66
6.3	Der Adhäsionsindex (AI) <i>vor</i> und <i>nach</i> TF mittels PADA	69
6.4	CD62P der TAK-PLT <i>vor</i> und <i>nach</i> TF sowie CCI und Recovery <i>nach</i> TF	73
6.5	Fazit der Diskussion im Kontext der eigenen Ergebnisse: AI, CD62P, Recovery und CCI der TAK-PLT <i>nach</i> TF und deren Bedeutung für die TF	75
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Literatur und Quellenverzeichnis</b>	<b>83</b>
8.1	Publikationen anderer Autoren	83
8.2	Eigene Publikation/Abstract	95
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>96</b>
9.1	Danksagung	96
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	97
9.3	Lebenslauf	98



## 1 Zusammenfassung

Die stetig ansteigende Zahl der Thrombozytentransfusionen (TF) der letzten Jahre ist wesentlich in Thrombozytopenien bei primär und sekundär bedingter Knochenmarksinsuffizienz begründet, bei denen eine TF von Blutprodukten, wie Thrombozyt-Apheresse-Konzentrat-Plättchen (TAK-PLT), erforderlich werden kann. TAK-PLT sind Arzneimittel. Damit unterliegen ihre Herstellung, Verwendung und Sicherung der Qualität dem Arzneimittelrecht. Die dafür verantwortliche Behörde, das Paul-Ehrlich-Institut (PEI), schreibt bisher den einmaligen Qualitätsnachweis vor Neueinführung eines Arzneimittels vor, wie z.B. die Darstellung der Thrombozytenfunktion in TAK über die Lagerungsdauer. Für eine lege-artis Therapie mit PLT sind allerdings routinemäßige und standardisierte Thrombozytenfunktionstests unabdingbar, um aus klinisch-therapeutischen und letztlich auch ökonomischen Gesichtspunkten eine optimale Versorgung sicherstellen zu können. Für dieses hohe Ziel eignet sich der „Platelet ADhesion Assay“ (PADA), welchen wir in unserer Untersuchung verwendeten. Derzeit besitzt er noch keine Zulassung für den geforderten Funktionsnachweis. Er reflektiert mit der Bestimmung des Adhäsionsindex (AI) aber die für die Hämostase unabdingbare Adhäsion der PLT an unlöslichen Oberflächen und gelingt ohne Zusatz von Agonisten sowohl mit Thrombozyten aus frischen und gelagerten TAK (*vor* TF) als auch im citrierten Vollblut (*nach* TF). Wir untersuchten den lagerungsabhängigen AI mit einem Referenzwert von  $50 \pm 11$  der PLT an 93 TAK. Dabei erfolgten die Messungen an 2,3,4,5 oder 6 Tage gelagerten TAK unmittelbar *vor* TF und ca. 1 Stunde *nach* TF, wobei dem Tag 6 aufgrund der neuen TF-Richtlinien (Votums 38 vom 09. Juni 2008 des Arbeitskreises Blut des Robert-Koch-Institutes [RKI]) weniger Bedeutung beigemessen wurde. Nach diesen dürfen Thrombozytenkonzentrate (TK) nur noch bis Tag 5 transfundiert werden.

Der PADA bei den TAK *vor* TF wurde jeweils im Doppelansatz durch entsprechenden Zusatz von Testerythrozyten (RBC) mit einem annähernd physiologischen Hämatokrit (HK) im Mittel von 0,39 bzw. einem patientenadäquaten HK im Mittel von 0,23 durchgeführt, um die Korrelation und die hochsignifikante Abhängigkeit des AI vom HK zeigen zu können ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,651$ ). Die Möglichkeit zur Restauration der noch zur Adhäsion fähigen PLT im Konzentrat bleibt somit hämatokritabhängig erhalten. Das Erreichen eines HK von mindestens 0,30 durch die Gabe eines Erythrozytenkonzentrates (EK) kann die Blutungsneigung bei thrombozytopenischen Patienten zusammen mit der PLT-TF maßgeblich beeinflussen, da PLT zur Entfaltung ihrer adhäsiven Eigenschaften vollblut-

ähnliche Viskosität brauchen. Auf diese Weise wird die Bedeutung des HK in Form von RBC und den damit verbundenen rheologischen Eigenschaften des Blutes erkennbar.

Weiterhin sind an diesen Tagen der PLT-Aktivierungsmarker P-Selektin (CD62P) *vor* und *nach* TF sowie das korrigierte Inkrement (CCI) und die Recovery *nach* TF ermittelt worden.

Bei den Versuchen mit dem PADA an TAK-PLT *vor* und *nach* TF hat sich, wie erwartet, gezeigt, dass sich die Adhäsivität der PLT mit der Zunahme der Lagerungszeit signifikant verschlechtert. Besonders gravierend zeigte sich dabei ein Abfall des AI ab einer Lagerungszeit von mehr als 3 Tagen. Er lag bei den TAK-PLT *vor* TF am Tag 2 durchschnittlich bei  $14,2 \pm 0,9$ , am Tag 3 bei  $13,8 \pm 1,1$  und fiel bis zum Tag 4 auf einen Wert von  $10,7 \pm 1,1$  bzw.  $10,6 \pm 1,3$  am Tag 5 ab. Noch deutlicher erwiesen sich die Messdaten der TAK-PLT *nach* TF: Der Tag 2 ergab einen AI von  $57,1 \pm 3,4$  und der Tag 3 lag noch relativ hoch bei  $53,4 \pm 2,5$ . Am Tag 4 sank er jedoch auf einen Wert von  $41,8 \pm 3,3$  ab und war mit einem AI von  $41,4 \pm 2,4$  am Tag 5 nahezu unverändert ( $p < 0,01$ ). Die Citrierung der PLT während der Herstellung und Lagerung im TAK *vor* TF führt zu Hypofunktionalität und bedingt das verlangsamte Reaktionsvermögen bzw. den niedrigeren AI im Vergleich zu den PLT der TAK *nach* TF.

Des Weiteren stieg mit zunehmender Alterung der TAK-PLT *vor* TF deren Voraktivierung hochsignifikant an: Zunahme von CD62P ( $p < 0,001$ ). *Nach* TF kam es zu einem inversen Verlauf des CD62P: Es fiel lagerungsabhängig signifikant ab ( $p < 0,05$ ). Da CD62P-positive und damit aktivierte PLT bevorzugt aus der Blutzirkulation entfernt werden, führt demnach eine niedrige Voraktivierung frischer TAK *vor* TF zu einer verminderten Eliminierung *nach* TF mit einem dementsprechend hohen CCI und Recovery. Bei alten TAK-PLT mit hoher Voraktivierung *vor* TF kommt es somit zur zunehmenden Eliminierung *nach* TF und konsekutiv zur signifikanten Abnahme des CCI und der Recovery ( $p < 0,05$ ). Diese signifikante lagerungs- und voraktivierungsabhängige Abnahme des CCI und der Recovery konnten wir in unseren Untersuchungen nachweisen.

Mit unserer Arbeit war es möglich, zusätzlich zur Messung der Funktion von TAK-PLT *vor* TF, erstmalig die Funktion derselben PLT *nach* TF an Patienten in Aplasie zu zeigen. Resümierend sollten routinemäßig Funktionsuntersuchungen (Patientenblutprobe *nach* PLT-TF) zur Qualitätssicherung von TAK-PLT erfolgen. Unter Nutzung des standardisierten und kostengünstigen PADA zeigen unsere Ergebnisse, dass nur bis Tag 3 gelagerte TAK-PLT bei einem möglichst physiologischen HK übertragen werden können, da sie aufgrund ihrer optimalen Funktion einen ausreichenden hämostatischen Effekt *nach* TF gewährleisten.

## 2 Einleitung

### 2.1 Allgemeines

Ein großer Aufgabenbereich der Thrombozyten, die Regulation der primären Hämostase, ist schon seit vielen Jahren bekannt. Doch erst in den 80iger Jahren wurden viele weitere Aspekte, wie ihre essentielle Rolle in der Immunologie und ihre Bedeutung bei Heilungsprozessen, erforscht und bekannt. Das Wissen und Verständnis dieser verschiedenen Funktionen ist maßgeblich wichtig, um den Zusammenhang zwischen Grundlagenforschung und deren Bedeutung und konsekutiven Verwendung im Klinischen Alltag, z.B. der Transfusion von Thrombozyten, zu erkennen, zu nutzen und zu optimieren. Da das Anliegen und die Methodik unserer Untersuchung auf grundlegenden Funktionen der Plättchen (PLT) basiert und dies uns klinisch außerordentlich relevant erscheint, versuche ich im Einleitungskapitel wesentliche Forschungsergebnisse möglichst übersichtlich darzustellen.

### 2.2 Die Morphologie und Physiologie von Thrombozyten

#### 2.2.1 Übersicht

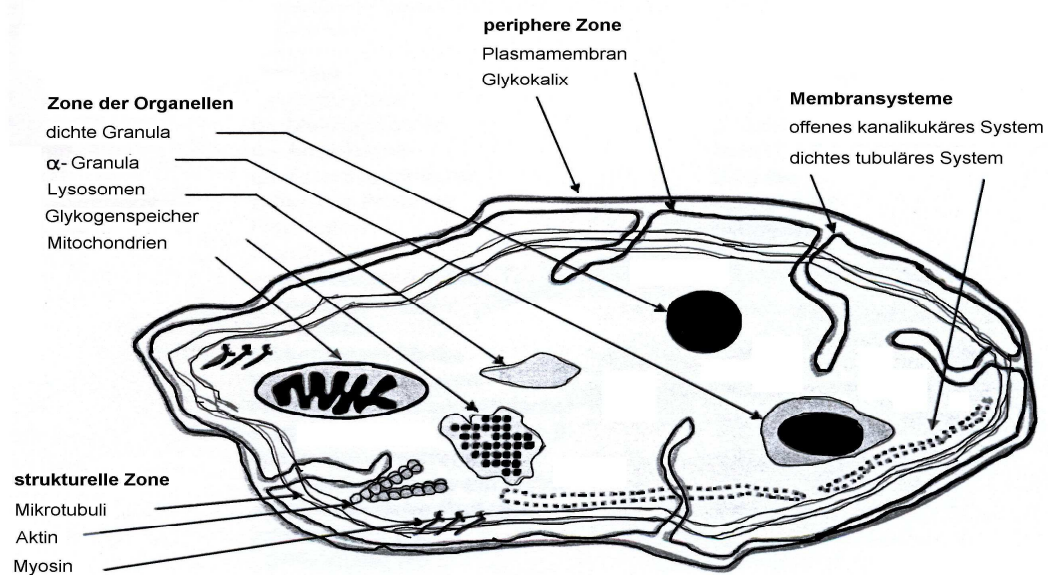
Die im Knochenmark lokalisierten Megakaryozyten sind die Vorläuferzellen der Thrombozyten, welche jeweils durch Demarkation bis zu 4000 Blutplättchen (mittleres Volumen ca. 4-10fl) ins Blut freisetzen. Davon zirkulieren ungefähr 70% im peripheren Blut, während ca. 30% für den Bedarfsfall in der Milz gespeichert werden. Diese Wiederfindungsrate (engl.: *Recovery*) ist bei Hypersplenismus entsprechend niedriger bzw. bei fehlender Milz höher. Die physiologische Zahl (Referenzwert) beträgt bei Erwachsenen ca. 150 bis 450 PLT/nl Blut (Patel et al. 2005) und vermindert sich pathologisch z.B. bei erhöhtem Verbrauch oder erhöht sich pathologisch durch die Regeneration beeinflussende Faktoren wie z.B. entzündliche Erkrankungen. Täglich werden ca. 20% neue Thrombozyten aus dem Knochenmark ausgeschwemmt. Die PLT sind die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile. Ihre begrenzte Lebensdauer beträgt bei gesunden Personen  $9,5 \pm 0,6$  Tage und ihr Verschwinden ist allgemein linear, welches vorrangig den Alterungsprozess von Thrombozyten widerspiegelt (Shulman NR 1987, Hanson und Slichter 1985, Harker und Finch 1969, Aster 1966). Der Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System (RES) der Leber und Milz. Obwohl die PLT keinen Zellkern besitzen („anukleäre Zellen“), sind sie

dennoch nach Aktivierung zur Neusynthese einiger Proteine aufgrund von mRNAs ihrer Vorläuferzelle fähig (Weyrich et al. 2004). Neben ihrer Schlüsselfunktion in der Blutstillung (Clemetson 1999) spielen sie auf Grund dessen auch im Rahmen der Immunabwehr eine wichtige Rolle. Sie sezernieren z.B. hochpotente antimikrobielle Substanzen (Fitzgerald et al. 2006), speichern inflammatorische Mediatoren wie Chemokine (von Hundelshausen und Weber 2007) und könnten am Heilungsprozess einer Gewebsverletzung durch Rekrutierung von Knochenmarkvorläuferzellen mittels spezieller Chemokine fördernd beteiligt sein (Massberg et al. 2006).

PLT vermitteln über Interaktion per Oberflächenproteine und Chemokine nicht nur die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und modifizieren deren Transmigration durch dieses direkt in entzündetes Gewebe, sondern beeinflussen auch extravaskulär die Funktion von Leukozyten (Jurk und Kehrel 2005). Aufgrund dieser Interaktionen sind sie allerdings auch bei der Entstehung und Progression von entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der arteriosklerotischen Plaque maßgeblich beteiligt (Daub et al. 2006).

### 2.2.2 Morphologie

Thrombozyten weisen eine komplexe innere Struktur auf, welche man entsprechend ihrer Morphologie in vier verschiedene Zonen unterteilen kann (Abb. 1).



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Ultrastruktur ruhender PLT (Gawaz 1999).

**Periphere Zone:**

Sie besteht aus der Zytoplasmamembran, einer Phospholipid-Doppelschicht, in die verschiedene Membranproteine integriert sind („Fluid-Mosaik-Modell“ nach Singer und Nicolson 1972) und einer äußeren Glykokalix, bestehend aus Proteinen, Glykoproteinen (GP) und Mukopolysacchariden. Viele der GP besitzen als Oberflächenrezeptoren spezifische Funktionen.

**Strukturelle Zone:**

In diesem Bereich befinden sich submembranös gelegene Strukturproteine, wie z.B. Mikrotubuli, Aktin und Myosin, welche das Zytoskelett bilden und für die typische diskoide Form im ruhenden sowie aktiv an der Formänderung im aktivierten Zustand der PLT verantwortlich sind.

**Zone der Organellen:**

Sie enthält neben Mitochondrien und Glykogenspeicher drei verschiedene, für PLT typische Speichergranula:  $\alpha$ -Granula, dichte Granula und Lysosomen. Am häufigsten kommen die  $\alpha$ -Granula vor. Sie enthalten Wachstumsproteine, Zytokine, wichtige Enzyme, Adhäsionsproteine und Gerinnungsfaktoren, die an spezifischen Funktionen (Proliferation, Aggregation, Chemotaxis, Inflammation) beteiligt sind. Die dichten Granula enthalten niedermolekulare Verbindungen wie Serotonin, Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP), welche den Aggregationsvorgang forcieren. Lysosomen speichern vorwiegend hydrolytische Enzyme.

**Membransysteme:**

Diese Zone umfasst das offene kanalikuläre System und das dichte tubuläre System. Das kanalikuläre System enthält transzelluläre Membranstapel, welche nach Aktivierung der Thrombozyten mit der Zytoplasmamembran verschmelzen können und wodurch z.B. GP, die unter anderem Membranrezeptorfunktionen besitzen, an die Zelloberfläche gelangen. Somit kann dieses System dem Stoffaustausch und gleichzeitig der Oberflächenvergrößerung dienen, da es mit dem Zellinneren und der Plättchenoberfläche verbunden ist. Das tubuläre System fungiert als Hauptspeicherort für freie  $\text{Ca}^{2+}$  und spielt somit eine zentrale Rolle in der Regulation des Metabolismus und der Aktivierung von Plättchen.

### 2.2.3 Membranglykoproteine

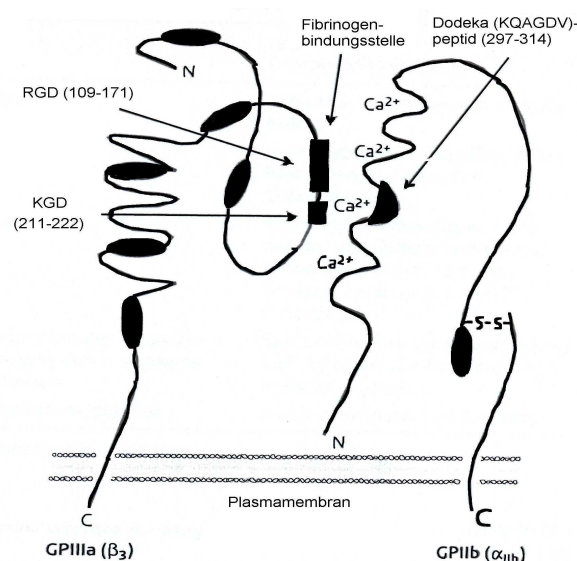
Die Glykokalix, welche die Zytoplasmamembran umhüllt, enthält thrombozytäre Rezeptoren für verschiedene Plättchenagonisten und –inhibitoren. Außerdem kommen diese Rezeptoren,

auch Membranglykoproteine (GP) genannt, in löslicher Form im Plasma vor. Sie werden gemäß ihrer Molekülstruktur in vier Gruppen eingeteilt: Integrine, leuzinreiche GP, Selektine und immunglobulinähnliche Adhäsionsrezeptoren. Alle können PLT aktivieren und somit eine Formänderung von diskoid zu sphärisch mit Ausbildung von Pseudopodien bewirken.

### Integrine:

Das wichtigste GP, das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  bzw. der Fibrinogenrezeptor GP IIb IIIa, wird mit einer Anzahl von 60 000 bis 100 000 pro PLT (Gawaz et al. 1991) am stärksten von ihnen exprimiert und ist mit einem Gesamtproteingehalt von ca. 1-2% das häufigste GP der Zytoplasmamembran (Gawaz 2001). Im Ruhezustand eines PLT sind ca. 70% auf der Oberfläche integriert, während die verbleibenden 30% im „surface connecting system“ (SCS) sowie in intrazellulärer  $\alpha$ -Granula gespeichert sind (Morgenstern 1997, Nurden 1994) und im Falle einer Aktivierung ebenfalls an die Plättchenmembran gelangen können (Woods et al. 1986). Nach Plow et al. 1992 besteht dieser Rezeptor aus einer  $\alpha$ - (GP IIb) und einer  $\beta$ -Untereinheit (GP IIIa) (siehe Abb. 2).

An der Adhäsion sind verschiedene GP beteiligt. Die PLT-Aggregation wird ausschließlich durch das GP IIb/IIIa vermittelt. Da es eine Schlüsselrolle für die primäre Hämostase spielt, ist es für die normale Aggregation essentiell (Nurden 2006, Nurden und George 2006, Nurden und Nurden 2001). Es hält über Fibrinogenbrücken die PLT zusammen (Phillips et al. 1998, Collier 1997, Collier 1992, Collier 1990). Weiterhin kann es von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibronektin, Vitronektin, Thrombospondin, sowie Prothrombin (Byzova und Plow 1998) binden.



**Abbildung 2** Struktur des GP IIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor) (nach Gawaz 1999).

Unterschieden werden zwei verschiedene Funktionszustände: im nichtaktivierten und niedrigaffinen Funktionszustand kann GP IIb-IIIa nur (kollagen-) immobilisiertes Fibrinogen binden, welches sich z.B. subendothelial nach Gewebeläsion präsentiert. Lösliches, plasmatisches Fibrinogen kann nur im aktivierten und damit konformationsveränderten Zustand mit Freilegung von hochaffinen Fibrinogenbindungsstellen gebunden werden. Die Bindung von löslichem Fibrinogen führt zu einem dritten, dem ligandenbesetzten Konformationszustand (Shattil 2005, Gawaz 2001). Dies wiederum ermöglicht weitere Konformationsänderungen mit Expression von Liganden-induzierten-Bindungsstellen (LIBS) des GP IIb-IIIa und zu Rezeptor-induzierten-Bindungsstellen (RIBS) auf dem Fibrinogenmolekül. Die LIBS können die irreversible Fibrinogenbindung durch Liganden mit nachfolgender Aggregation einleiten (Moroi und Jung 1998).

Zur Gruppe der  $\beta$ 1-Integrine gehören der Fibronektinrezeptor (GP Ic-IIa), der Lamininrezeptor (GP Ic'-IIa) und der Kollagenrezeptor (GP Ia-IIa) (Plow et al. 1992). Kroll et al. 1996 untersuchten die von der Scherkraft abhängigen Bindungsspezifitäten dieser Rezeptoren. Insbesondere bei niedrigen Scherkräften können der Laminin- und der Fibrinogenrezeptor zur Aggregation führen, während der Kollagenrezeptor bei hohen Scherkräften optimal binden kann.

#### **Leuzinreiche GP:**

Das GP Ib-IX-V, ein Rezeptor für vWF, nimmt eine Schlüsselrolle bei der primären Adhäsion von PLT an das Subendothel ein. Besonders bei hohen Scherkräften kann Thrombospondin-1 an PLT über GP Ib binden und die Adhäsion ermöglichen (Jurk et al. 2003). Das GP IV (GP IIb) interagiert mit Kollagen und spielt ebenfalls bei der Plättchenadhäsion und Aktivierung anderer Rezeptoren eine Rolle (Nieswandt et al. 2001).

#### **Selektine:**

Ein weiteres thrombozytäres Glykoprotein ist GMP 140 aus der Familie der Selektine (P-Selektin). Selektine gehören zur Gruppe der heterophilen Zelladhäsionsmoleküle. Sie sind mit einer „epidermal-growth-factor-like“-Domäne ausgestattet. In den  $\alpha$ -Granula der PLT und in den Weibel-Paladen-Körperchen der Endothelzellen ist P-Selektin (CD62P oder GMP-140) lokalisiert (Larsen et al. 1989, McEver und Martin 1984, Hsu-Lin et al. 1984). Von ruhenden Thrombozyten wird es nicht exprimiert, da es integraler Membranbestandteil der  $\alpha$ -Granula ist. Während der Aktivierung der PLT gelangt P-Selektin durch Verschmelzung der  $\alpha$ -Granula mit dem SCS an die Oberfläche und ist dort in mittlerer Rezeptordichte nachweisbar (McEver und Martin 1984). Nach Stimulation der Zellen mit Histamin, Thrombin oder Phorbol ester erreicht es innerhalb von zehn Minuten seine maximale Expression an der Zelloberfläche (Geng et al. 1990, Hattori et al. 1989). Werden

die PLT stärker aktiviert, kommt es zur kompletten Ausschüttung des CD62P aus der Zelle. Allerdings werden durch proteolytische Reaktionen im weiteren Verlauf vermehrt Rezeptoren wieder abgespalten, was eine Abnahme der CD62P-Oberflächendichte nach sich zieht (Rinder 1998).

CD62P kann als Ligand Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten binden (Hamburger und McEver 1990). Es vermittelt die Anlagerung von Leukozyten an geschädigtes Endothel. Aufgrund niedrigaffiner Rezeptorbindungen können die Leukozyten entlang dem Endothel auf die Läsion hin rollen (Furie et al. 2001, Bevilacqua et al. 1991). Außerdem beeinflusst P-Selektin inflammatorische Reaktionen in den Leukozyten und ist somit an der sekundären Hämostase beteiligt (Theilmeier et al. 1999). PLT können außerdem den GP Ib/V/IX-Komplex und das PSGL-1 auch nutzen, um über P-Selektin auf aktivierten Endothelzellen entlang zu rollen (Frenette et al. 2000, Romo et al. 1999).

#### **Immunglobulinähnliche Adhäsionsrezeptoren:**

Die Funktionen dieser Rezeptorfamilie in Thrombozyten sind weitgehend unbekannt. Beschrieben worden sind PECAM-1 und ICAM-2. Sie scheinen mit Leukozyten zu interagieren und Bedeutung für thrombozytenvermittelte Inflammation zu haben.

## **2.3 Hämostase**

### **2.3.1 Allgemeines**

Die Funktionen, die mit Thrombozyten zuerst in Verbindung gebracht werden, sind Kernprozesse der Blutstillung (Hämostase). Dieser hochkomplexe zellulär-biochemische Prozess bietet einen wirkungsvollen Schutz vor Blutverlusten, eine schnelle und vollständige Reparatur beschädigter Gefäße und ermöglicht durch eine intakte Blutperfusion eine optimale Gewebe- und Organversorgung. Man kann sie in die primäre (zelluläre) und sekundäre (plasmatische) Hämostase und die Fibrinolyse einteilen. Im Falle einer Endothelläsion werden Plättchen aus dem zirkulierenden Blut rekrutiert und dichten diese durch den reversiblen primär hämostatischen Thrombus (Gawaz 1999) ab (zelluläre Hämostase). Dies geschieht durch eine Folge von Interaktionen zwischen PLT und der subendothelialen Matrix (Adhäsion) sowie den PLT untereinander (Aggregation). Anschließend wird mittels Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems der sekundäre, feste Thrombus gebildet (plasmatische Hämostase). Abschließend kann nach kompletter Läsionsreparatur der gebildete Thrombus wieder aufgelöst werden (Gawaz 2001).



### 2.3.2 Plättchenaktivierung durch Scherstress

Neben biochemischen Aktivatoren können lokale Flussbedingungen und deren hydrodynamische Eigenschaften die Plättchenaggregation *in vitro* (fließende Lösungen) und *in vivo* (Blutzirkulation) beeinflussen. Physikalische Größen, wie die Scherrate, der Scherstress und die Viskosität beschreiben diese Eigenschaften fließender Suspensionen, wie z.B. Blut. Die Scherrate (Schergeschwindigkeit) wird aus dem Verhältnis zwischen dem Geschwindigkeitsunterschied zweier benachbarter Flüssigkeitsschichten (Blutvolumen) und deren Abstand (Größe der Blutgefäße) berechnet. Die Viskosität des Blutes wird hauptsächlich durch den Hämatokrit bestimmt. Typisch für Vollblut ist eine Viskosität von 4,5 mPas und für Plasma von 1,73 mPas. Das Produkt von Scherrate und Viskosität entspricht dem Scherstress. Besonders in stenotischen Gefäßen sind die Scherraten hoch, während sie in großen Arterien und Venen niedriger ausfallen (siehe Tab. 1 und Tab. 2).

**Tabelle 1** Scherraten und Scherstress in Gefäßen nach Kroll et al. 1996.

Blutgefäße	Scherrate in $s^{-1}$	Scherstress in $dynes/cm^2$
Venen	20 - 200	0,7 - 7,6
Große Arterien	300 - 800	11,4 - 30,4
Arteriolen	500 - 1600	19,0 - 60,8
Stenotische Gefäße	800 - 10000	30,4 - 380,0

Der Scherstress, bzw. die Scherrate können auf verschiedenen Wegen die Thrombozytenaggregation beeinflussen: z.B. die Kollisionsfrequenz der Plättchen in der Suspension miteinander sowie die ADP-Freisetzung aus dichten Granula (Belval et al. 1984, Anderson et al. 1978). Mit steigendem Scherstress nimmt die Effizienz der Plättchenadhäsion ab (Pareti et al. 2000) und die Bindungskinetik von Fibrinogen an den aktivierten GP IIb-IIIa kann variieren (Belval et al. 1984). Der vWF kann bei höherem Scherstress GP Ib-IX aktivieren (Ikeda et al. 1991) und PLT aggregieren (Ruggeri 1993). Diese auf die Plasmamembran einwirkenden Kräfte werden von dem Zytoskelett aufgenommen und an das Zellinnere weitergegeben. Die Interaktionen der Zellen mit dem Extrazellularraum sollen über Proteinkinasen, Integrinen oder direkte Einflüsse des Zytoskeletts auf den Zellkern stattfinden (Ali und Schumacker 2002). Zunehmender Scherstress hat ebenfalls Auswirkung auf die Morphologie und Funktion von Endothelzellen. Levesque und Nerem 1989 beschrieben, dass es ohne Schädigung zu einer länglichen und in Flussrichtung ausgerichteten Gestaltsänderung komme; weiterhin werde vermehrt stark vasokonstriktives Endothelin-1 (ET-1) von den Endothelzellen exprimiert (Uematsu et al. 1995), was langfristig atherogen und konsekutiv thrombogen wirkend sein kann.

### 2.3.3 Funktionsstadien von Thrombozyten

Unter physiologischen Konditionen befinden sich Thrombozyten im ruhenden, nicht aktivierten Zustand. Auch unter hohen Strömungsbedingungen kommt es nicht zu einer (adhäsionsbedingten) Aktivierung oder Aggregation der PLT (Gawaz et al. 1995, Collier 1991, Fitzgerald 1987, Phillips et al. 1987). Bei einer Endothelläsion werden stark adhärenente Proteine der Subendothelschicht, wie der “von-Willebrand-Faktor“ oder Kollagen freigelegt, woraufhin die Plättchen ans Endothel anhaften können (Ruggeri 1994, Sixma 1994).

#### 2.3.3.1 Adhäsion

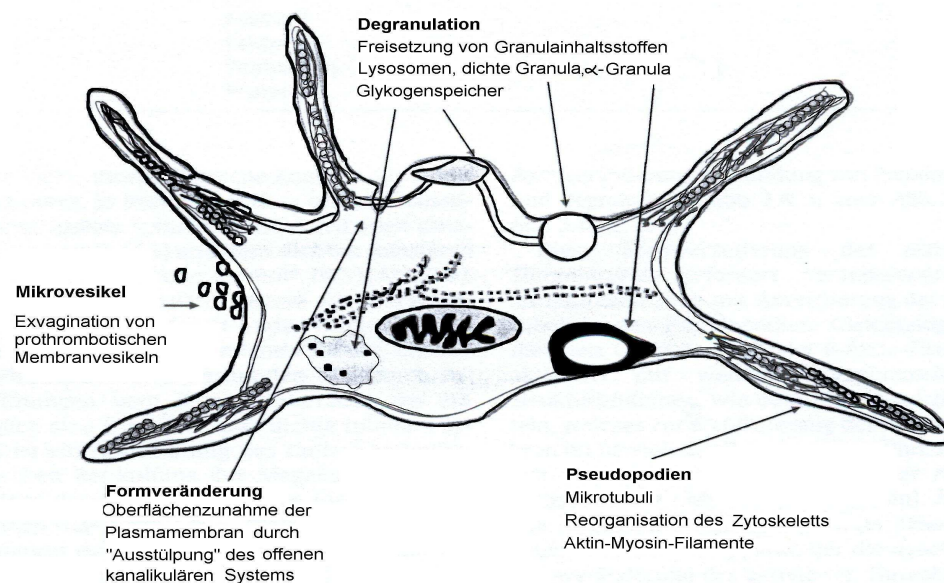
Bei einer Verletzung des Endothels ist der erste Schritt der primären Hämostase die Adhäsion ruhender PLT über den GP Ib/V/IX/Komplex an kollagen-immobilisierten vWF des Subendothels (primäre Adhäsion). Dabei wird wahrscheinlich der vWF durch seine Bindung an das exponierte subendotheliale Gewebe (Kollagen) so verändert, dass GP Ib binden kann (Kehrel 2003). Dies ist besonders bei hohem Scherstress (arterielles Stromgebiet) möglich. Als sekundäre Adhäsion der primären Hämostase bezeichnet man die Anlagerung bereits aktivierter Thrombozyten an Strukturen des Subendothels (Andrews et al. 1997, Ruggeri 1994, de Groot und Sixma 1990).

Während der **Kontaktphase** der primären Adhäsion bremsen die GP Ib/V/IX/vWF-Komplexe die PLT, heften sie an der Gefäßläsion an (Nurden 1994) und starten den Aktivierungsprozess (Clemetson und Clemetson 1995). Diese Aktivierung erfolgt über eine Quervernetzung mehrerer GP Ib-Rezeptoren auf PLT durch vWF-Multimere. Dadurch wird eine Signalkaskade mit Aktivierung der Integrine ausgelöst. Das  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (GPIa/IIa) ist der wichtigste sekundäre Adhäsionsrezeptor für eine Stabilisierung der Plättchenadhäsion. Er bindet an die Hauptproteine (Kollagene) der subendothelialen Matrix. Die Adhäsion an Kollagene spielt eine entscheidende Rolle in der primären Hämostase (Kehrel 1995). Weiterhin sind die (GP Ic/IIa) Fibronektin- und (GP Ic'/IIa) Lamininrezeptoren an dieser sogenannten **Stabilisierungsphase** beteiligt. Die Adhäsionsproteine weisen spezifische Affinitätsoptima bei entsprechenden Scherstressgrößen auf (siehe Tab. 2).

**Tabelle 2** Scherstress und Adhäsionsrezeptoraktivierung nach Kroll et al. 1996.

Scherstress in dynes/cm <sup>2</sup>	Membranglykoprotein	Adhäsionsprotein
0 - 12	GP Ic/IIa, GP Ic'/IIa	Fibronektin/Laminin
12 - 18 (52)	GP IIb/IIIa	Fibrinogen
>30	GP Ib/V/IX, GP Ia/IIa	vWF Kollagen
64	GP IV	Thrombospondin

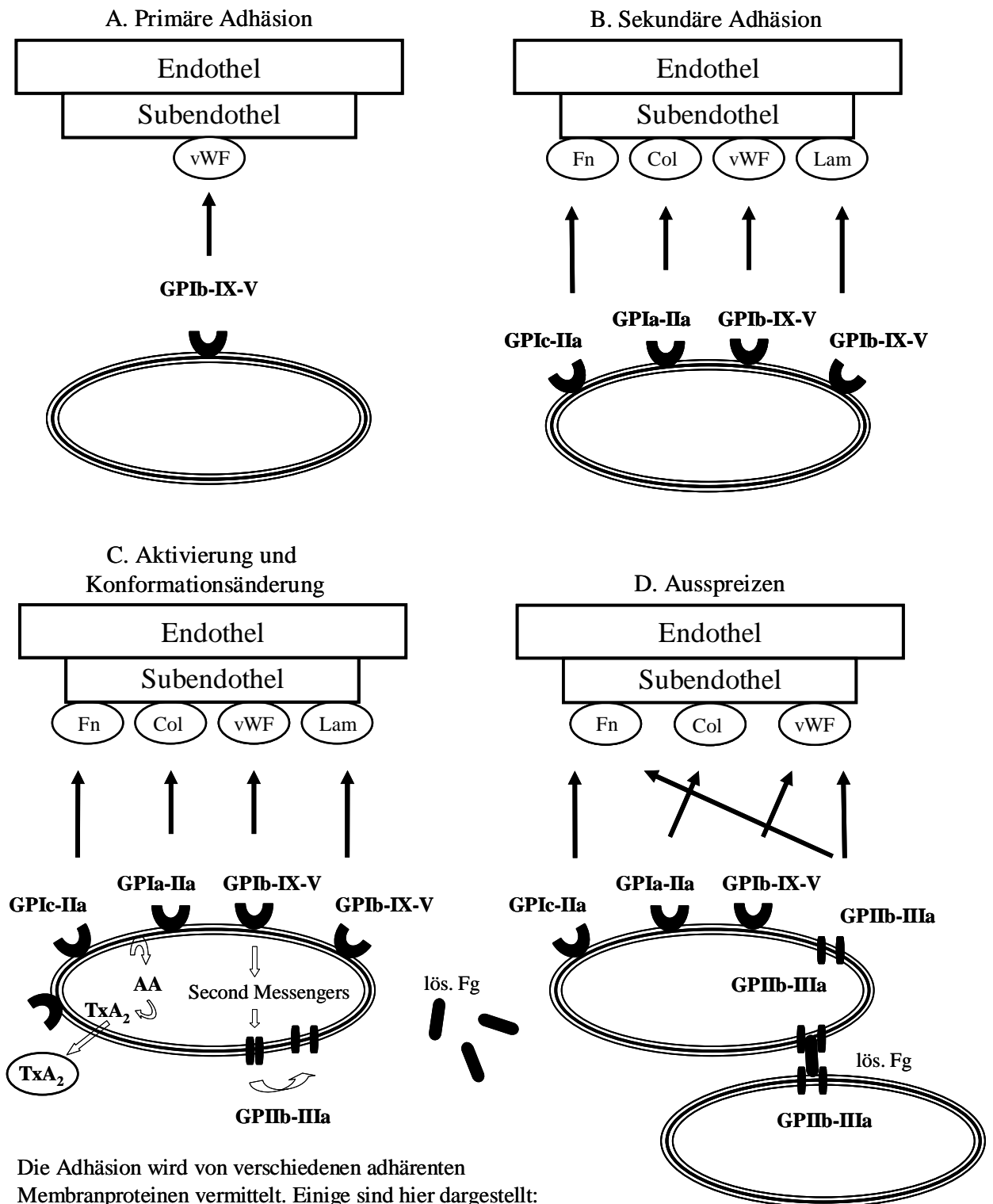
GP Ia/IIa bewirken wiederum mittels Quervernetzung und konsekutiven Signalkaskaden sowie einer Vielfalt physiologischer Aktivatoren, wie Kollagen, Thrombin oder ADP (Goldsmith et al. 1998), eine schnelle Gestaltsänderung („shape change“) der Thrombozyten mit Verlust ihrer glattflächigen, diskoiden Form sobald die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine bestimmte Schwelle überschreitet (Phase der Aktivierung). Die Formänderung führt durch Ausstülpungen der Zytoplasmamembran (Pseudopodien) zur Ausspreizung der Thrombozyten (siehe Abb. 3). Das begünstigt eine effiziente Abdichtung der Läsion (Phase des Ausspreizens).

**Abbildung.3** Schematische Darstellung der Ultrastruktur aktivierter Plättchen (nach Gawaz 1999).

Mit der Aktivierung der PLT durch vWF, Kollagen und anderen Agonisten kommt es zur Sekretion von  $\alpha$ -Granula und dichten Körperchen über Exozytosevorgänge (Jurk und Kehrel 2008). Hierbei gelangen neben zusätzlichen Rezeptorkomplexen durch Fusion der Granulamembranen mit der Plasmamembran auch Plättchenagonisten, wie ADP, Adrenalin und Thromboxan A<sub>2</sub>, an die Oberfläche. Über GTP bindende G-Proteine (Offermanns 2006) verstärken diese Agonisten entweder auf dem autokrinen Wege den eigenen Aktivierungsvorgang oder aktivieren parakrin ruhende PLT (Siess 1989) und regen diese zur

Aggregation an (Ruggeri 1994). ADP ist hierbei der bedeutendste Agonist für die Verstärkung einer Plättchenaktivierung (Gachet 2001). Weiterhin führen metabolische und biochemische Veränderungen im PLT zu Veränderungen von Membranphospholipiden, die eine wesentliche Rolle für eine spätere sekundäre Hämostase (plasmatische Gerinnung) spielen.

Eine PLT-Aktivierung kann somit entweder durch den Kontakt z.B. mit Kollagen bzw. vWF erfolgen bzw. indirekt durch Agonisten der PLT-Granula, wie Thromboxan, ADP, Adrenalin oder plasmatisches Thrombin, getriggert werden. Die Aktivierung der Thrombozyten bewirkt eine weitere Stimulation eines wichtigen Rezeptormoleküls: die Aktivierung des GP IIb/IIIa-Komplexes (Fibrinogenrezeptor). Eine daraufhin bedingte Konformationsänderung im Rezeptor ermöglicht so die Bindung löslichen Fibrinogens (Gawaz et al. 1999) und führt zu einer sehr hohen Affinität zu Fibrinogen und anderen Adhäsionsmolekülen (Fitzgerald 2001). Im ruhenden, nicht aktivierten Zustand der PLT ist lösliches plasmatisches Fibrinogen nicht in der Lage an die Thrombozytenoberfläche zu binden. Dieses kann über spezifische Bindungsstellen zwei Thrombozyten binden und miteinander vernetzen (Aggregation) (Coller et al. 1995). Es stellt den engen Kontakt der PLT mit dem Endothel sowie die Ausbreitung auf dem Endothel sicher (Gawaz et al. 1994, Nurden 1994). Wenn die PLT vollständig über dem Subendothel ausgespreizt sind, ist das Endstadium der Adhäsion erreicht (Nurden 1994); siehe Abb. 4.



Die Adhäsion wird von verschiedenen adhärenenten

Membranproteinen vermittelt. Einige sind hier dargestellt:

AA Arachidonsäure; lös. Fg lösliches Fibrinogen; Fn Fibronectin;

Kol Kollagen; Lam Laminin; TxA<sub>2</sub> Thromboxan A<sub>2</sub>; vWF von-Willebrand-Faktor.

Bei Verletzung des Endothels werden diese Proteine der Subendothelschicht freigelegt, woraufhin Thrombozyten mit ihren spezifischen Membranrezeptoren (GP) an diese anhaften können (Pfeile).

**Abbildung 4** Übersicht über die Thrombozytenadhäsion.

### 2.3.3.2 Aggregation

Allgemein bezeichnet man die Koadhäsion zweier PLT als Aggregation. Es ist seit langem bekannt, dass die Fibrinogenbindung an den exprimierten GP IIb/IIIa Rezeptor auf aktivierten PLT die Voraussetzung für die Plättchenaggregation darstellt (Plow und Ginsberg 1989, Peerschke 1985, Niewiarowski et al. 1983, Marguerie et al. 1980). Dies wird durch Fibrinogenbrücken bewirkt (Ginsberg et al. 1995, Plow et al. 1992, Gawaz et al. 1991, Siess 1989). Diese Brücken können auch diskoidale, also primär ruhende PLT während des ersten Thrombozyten-Thrombozyten-Kontaktes miteinander vernetzen. Damit stellt der Formwandel keine Voraussetzung für eine Aggregation dar (Morgenstern et al. 2001).

Dieser zunächst reversible PLT-Fibrinogen-PLT Komplex (primäre Phase) führt zusammen mit Sekretinhaltsstoffen (siehe Adhäsion), welche der Thrombozyt nach Aktivierung freisetzt, und plasmatischen Gerinnungsfaktoren zu einer stabilen, irreversiblen Aggregation durch Konformationsänderungen bei beiden Partnern (sekundäre Phase).

Fibrinogenunabhängig kann der GP IIb-IIIa-Rezeptor auch direkt RGD-Sequenz (Arginin-Glyzin-Aspartat) -enthaltende Peptide, wie z.B. vWF, nach vorangegangener Aktivierung binden und daraufhin LIBS (siehe Kapitel 2.1.3) freilegen (Plow et al. 1992). Diese fibrinogenunabhängige vWF-Bindung an das GP IIb/IIIa erfolgt insbesondere unter Blutflussbedingungen bei hohen Scherkräften: Über eine Primärbindung des vWF an den GP Ib/V/IX-Komplex des ruhenden PLT wird das GP IIb/IIIa über Signalkaskaden aktiviert. Durch die resultierende Konformationsänderung können die GP IIb/IIIa vWF adhären und so stabile vWF-vermittelte Thrombozytenaggregate entstehen (Ruggeri 1993). Die fibrinogenunabhängige Bindung ist allerdings different zu den Fibrinogenbrücken, da diese über „spiegelbildliche“ Enden verfügt.

## 2.4 Funktionsdiagnostik der Thrombozyten

Die Untersuchungsmethoden können in Basisdiagnostik und spezielle Diagnostik der Thrombozyten unterteilt werden. Die Basisdiagnostik umfasst unter anderem die Bestimmung der Thrombozytenzahl, der Blutungszeit sowie des mittleren Plättchenvolumens (MPV).

Der Referenzwert der **Thrombozytenzahl** liegt bei gesunden Erwachsenen zwischen 150-450/nl Blut.

Die **Blutungszeit** ist ein Suchtest zur Erkennung von Störungen der Zahl und Funktion der PLT. Sie ist insbesondere bei Thrombozytopenien unter 100/nl und bei Thrombozytopathien

wie auch bei Störungen der Gefäßwandfunktion und der plasmatischen Gerinnung verlängert.

Der Parameter **MPV** wird in der Einheit Femtoliter (fl; 1fl =  $10^{-15}$  Liter) mit einem Normbereich für Männer von 9.4 bis 12.6 und für Frauen von 9.4 bis 12.5 angegeben. Volumina über 10fl können Hinweise auf Umsatzstörungen geben und sind extrem selten infolge bestimmter angeborener Thrombozytopenien (Scharf 2003a). Er reflektiert den Grad der Thrombozytenstimulation und wird zunehmend als prognostischer Parameter für vaskuläre Erkrankungen angesehen (Pizzulli et al. 1998). Auch eine klinische Studie untersuchte das Thrombozytenvolumen als Prognosefaktor nach Herzinfarkt. Es zeigte sich, dass das relative Risiko binnen zwei Jahren nach dem Infarkt zu versterben, in jener Gruppe, deren mittleres Thrombozytenvolumen im oberen Viertel angesiedelt war, um den Faktor zwei erhöht war gegenüber der Gruppe im unteren Viertel (Dtsch Ärztebl 1997). Als gesichert gilt eine inverse Korrelation mit der Plättchenzahl (Baynes et al. 1988, Hakim und Lazarus 1988, Hakim und Schafer 1985, Lippi und Cappelletti 1984, Levin und Bessman 1983, Facquet-Danis et al. 1982, Bessman et al. 1981, Giles 1981).

Auf einige spezielle diagnostische Methoden zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion wird im Kapitel 2.8.3.1 „Qualitätssicherung von TAK“ näher eingegangen.

## **2.5 Thrombozytopathie und Thrombozytopenie als Ursachen hämorrhagischer Diathese**

Einer Blutungsneigung (hämorrhagischer Diathese, HD) können Störungen des Gerinnungs- oder Fibrinolysesystems (plasmatische HD), Gefäßdefekte (vaskuläre HD) sowie solche der PLT (Thrombozytäre HD) in Form einer Thrombozytopathie oder Thrombozytopenie zugrunde liegen (Hoffbrand 1997). Thrombozytäre Blutungsneigungen sind meist durch punktförmige Hautblutungen (Petechien) gekennzeichnet. Die häufigste Ursache einer hämorrhagischen Diathese ist die Thrombozytopenie.

### **2.5.1 Thrombozytopathie**

Thrombozytenfunktionsstörungen können entweder mit konsekutiver Plättchenthrombogenität pathologisch gesteigert oder vermindert sein, was als Thrombozytopathie bezeichnet wird. Entsprechend ihrer Pathologie kann die Aktivierung,

die Adhäsion, die Aggregation, die Sekretion oder die prokoagulatorische Aktivität betroffen sein (Scharf 2003b). Im Folgenden soll lediglich auf die Thrombozytopathie näher eingegangen werden, welche man grundlegend in angeborene (hereditäre) und erworbene unterscheidet (siehe Tab. 3).

**Tabelle 3** Einteilung der Plättchenfunktionsstörungen (Thrombozytopathien), nach Scharf 2003b.

<b>hereditäre Plättchenfunktionsstörungen</b>	<b>erworbene Plättchenfunktionsstörungen</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thrombozytenmembrandefekte, z.B.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Störungen der Adhäsion durch Mangel des GP Ib (Bernard-Soulier-Syndrom)</li> <li>○ Störungen der Aggregation durch Mangel am GP-Komplex IIb/IIIa (Glanzmann-Thrombasthenie)</li> </ul> </li> <li>• Störungen der Plättchensekretion, z.B.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Reduzierung der ADP-Freisetzung durch Mangel der Cyclooxygenase- und Thromboxansynthetase (Storage-Pool-Erkrankungen)</li> </ul> </li> <li>• abnorme prokoagulatorische Aktivität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medikamente, z.B.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ ASS</li> <li>○ Ticlopidin</li> <li>○ Clopidogrel</li> <li>○ Abciximab*, Eptifibatid, Tirofiban</li> </ul> </li> <li>• chronische Niereninsuffizienz</li> <li>• antithrombozytäre Antikörper</li> <li>• extrakorporale Zirkulation</li> <li>• chronische Lebererkrankungen</li> <li>• hämatologische Erkrankungen, z.B.               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ myeloproliferative Erkrankungen (MPD)</li> <li>○ Myelodysplasien (MDS) und akute Leukämien</li> <li>○ monoklonale Gammopathien</li> <li>○ erworbenes von-Willebrand-Syndrom (vWD)</li> </ul> </li> </ul>

\*Monoklonale Antikörper gegen Glykoprotein IIb/IIIa.

Vorwiegend bedingen zahlreiche Medikamente teils folgenreiche (erworbene) PLT-Defekte durch manipulative Eingriffe im thrombozytären Stoffwechselsystem. Einige Arzneimittelbeispiele sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4** Auswahl von Medikamenten, die die Thrombozytenfunktion hemmen können, nach Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008, Leitlinien der Bundesärztekammer 2003.

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thrombozytenaggregationshemmer (z. B. Acetylsalicylsäure [ASS], Clopidogrel, Ticlopidin, Fibrinogenrezeptor-Antagonisten, bestimmte nicht-steroidale Antirheumatika)</li> <li>• Antibiotika (z. B. Penicillin G, Ampicillin, Cephalosporine, Amphotericin B)</li> <li>• Künstliche Kolloide (Dextrane, hochmolekulare Hydroxyethylstärke)</li> <li>• Heparine und Heparinoide</li> <li>• Thrombolytika (vor allem Streptokinase)</li> <li>• Trizyklische Antidepressiva, Phenothiazine, Valproinsäure, Serotonin-Aufnahme-Hemmer</li> <li>• Lipidsenker (Clofibrat u. a.)</li> </ul>
---

Eine pathologische Blutungszeit ist neben der Anamnese und dem klinischen Befund wegweisend für einen Plättchenfunktionsdefekt, obwohl häufig die Thrombozytenzahl im Referenzbereich liegt; seltener kann sie allerdings auch vermindert oder erhöht sein.

Für eine Klassifizierung und Charakterisierung eines Plättchenfunktionsdefektes und dessen Pathophysiologie und klinischer Relevanz sind häufig sehr aufwendige Untersuchungen in speziellen Laboratorien unentbehrlich (Harris et al. 2008, Scharf 1996, Tomer et al. 1994,



George und Shattil 1991), da insbesondere die erworbenen Defekte zahlreich und bezüglich der kausalen molekularen und biochemischen Abweichungen weniger gut beschrieben sind (Scharf 2003b).

### 2.5.2 Thrombozytopenie

Eine Reduzierung der Thrombozytenzahl (Thrombozytopenie) im peripheren Blut unter den Referenzwertbereich (150 bis 450 PLT/nl Blut) verändert die primäre Hämostase, was an einer zunehmend verlängerten Blutungszeit und dem klinischen Kardinalsymptom von symmetrisch verteilten Petechien infolge erhöhtem hydrostatischen Druck und an mechanisch beanspruchten Hautbezirken erkennbar ist. Klinisch wichtig ist, dass thrombozytär bedingte Spontanblutungen allerdings erst als Folge hochgradig verminderter Thrombozytenkonzentrationen bei Werten unter 10 PLT/nl im peripheren Blut auftreten, wenn ansonsten keine weiteren Störungen des Gerinnungssystems, der Gefäßpermeabilität sowie andere Risikofaktoren vorhanden sind (Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008, Greinacher et al. 2006). Letztendlich bleibt die klinische Ausprägung bei gleichen Thrombozytenzahlen sehr verschieden und wird vor allem durch die Grunderkrankung mitbestimmt (Für nähere Informationen siehe Kapitel 2.6 „Thrombozytentransfusion“.).

Eine Thrombozytopenie kann erworben oder hereditär bedingt sein. Sie resultiert entweder aus einer Bildungsstörung, z.B. aufgrund einer verminderten oder ineffektiven Thrombozytenneubildung im Knochenmark (Knochenmarkinsuffizienz), aus einer Umsatzstörung mit gesteigertem Abbau oder Verbrauch von Blutplättchen, aus einer Verteilungsstörung durch Thrombozytenpooling in einer vergrößerten Milz (Hypersplenismus) oder aus einem Verdünnungseffekt, z.B. durch massive intravenöse Flüssigkeitssubstitution (siehe Tab. 5).

Denkbar sind auch mechanische Schädigungen, wie z.B. Herzklappen oder Dialyse, welche als Ursachen für eine Thrombozytopenie in Betracht kommen können. Das Fehlen jeglicher klinischer oder sonstiger Befunde, die für eine Thrombozytopenie sprechen würden, sollte immer auch an eine Pseudothrombozytopenie denken lassen. Bei diesem nicht-immunologischen Prozess kommt es ohne bisher vollständige Ursachenklärung zu einer Verklumpung der PLT im Hämatologie-Probenröhrchen (EDTA-Medium). Häufig werden die PLT-Aggregate von automatischen Zellzähl-Geräten als Pseudoleukozyten klassifiziert, was zu einer falsch hohen Leukozytenzahl führen kann.

**Tabelle 5** Ursachen von Thrombozytopenien.**Bildungsstörungen (aplastische Störung) und Reifungsstörung\*****• Verminderte Megakaryozytopoese (Bildungsstörung)**

- als angeborener Defekt (z.B. Fanconi-Anämie, kongenitale megakaryozytäre Hypoplasie)
- erworbene Knochenmarkschädigung (z. B. durch Medikamente [Zytostatika etc.], Strahlentherapie, Chemikalien [z.B. Benzol], Viren [z.B. HIV-Infektion], bakterielle Infektionen, aplastische Anämie, Autoantikörper gegen Stammzellen, „idiopathisch“)
- Knochenmarkinfiltration und Verdrängung (Knochenmarkkarzinose, Karzinometastasen, Leukämien, maligne Lymphome, Osteomyelofibrose etc.)

**• Ineffektive Thrombozytopoese (Reifungsstörung)**

- angeborene Formen (Wiskott-Aldrich-Syndrom, May-Hegglin-Anomalie, Alport-Syndrom, Fechtner-Syndrom u.a.)
- myelodysplastisches Syndrom
- paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)
- Vitamin-B12- und/oder Folsäuremangel

**Erhöhter Abbau bzw. Verbrauch****• Immunologische Mechanismen**

- primäre Autoantikörperbildung\*\*\* (Thrombozytenzerstörung durch Autoantikörper), z.B. idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP)
- sekundäre Autoantikörperbildung\*\*\* (Medikamente\*\*\* [immunologisch vermittelt, daher potentiell fast alle Medikamente; häufiger u. a. durch Antibiotika, Ranitidin, Thiaziddiuretika, Chinidin], speziell Heparin\*\*\* [bei ca. 5% der Patienten, die >5 Tage heparinisiert werden], Kollagenosen, Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom, Viren, maligne Lymphome, Immunkomplex-Erkrankungen)
- Alloantikörper (Posttransfusionspurpura\*\*\* = Posttransfusionsthrombozytopenie durch Induktion von Isoantikörpern [HLA-Antikörper], neonatale Alloimmunthrombozytopenie)

**• Nicht-immunologische Mechanismen**

- Verbrauchskoagulopathie (disseminierte intravasale Gerinnung [DIC]), z.B. bei Sepsis
- thrombotisch-thrombozytopenische Purpura/hämolytisch-urämisches Syndrom
- Präeklampsie/Eklampsie (HELLP-Syndrom)
- Gestations-Thrombozytopenie
- infektiöse oder mechanische Schädigung (z.B. bei mechanischem Herzklappenersatz)
- Verlust bei Blutung/Verdünnung bei Massivtransfusion
- von-Willebrand-Syndrom Typ 2B

**vermehrte Sequestration bzw. Zerstörung\*\***

- in der Milz bei Splenomegalie (Hypersplenismus)
- Mikroangiopathie (Zerstörung in entzündlich veränderten Kapillaren) bei thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (TTP), hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS)
- an Fremdkörpern, z.B. durch künstliche Herzklappen, Herz-Lungen-Maschine mit extrakorporalem Kreislauf; Dialysefilter

**kombinierte Störungen**

- z.B. bei Alkoholabusus und Leberschädigungen mit portaler Hypertension: Bildungsstörung, Reifungsstörung und vermehrter Abbau bei Splenomegalie (Hypersplenie), hypotherme Anästhesie
- Verdünnungskoagulopathie nach Massivtransfusion

**Mechanische Schädigung der Thrombozyten**

- künstliche Herzklappen
- Verwendung der Herz-Lungen-Maschine
- Dialyse mit extrakorporalem Kreislauf

**Laborartefakt**

- Pseudothrombozytopenie

\*mittleres Plättchenvolumen meist erniedrigt; \*\*mittleres Plättchenvolumen meist erhöht; \*\*\*Diese Formen werden aufgrund des Entstehungsmechanismus auch als Immunthrombozytopenien zusammengefasst.

## 2.6 Periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT)

### 2.6.1 Allgemeines

Die Periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT) ist heute eine etablierte Therapie mit Schwerpunkt in der Behandlung der akuten Leukämien und der malignen Lymphome inklusive des Plasmozytoms und hat sich vorwiegend an universitären hämatologischen Zentren einen festen Platz gesichert. Am 01.10.1980 wurde erstmals eine KMT bei einem Kind in Jena durchgeführt und seit dem 30.10.1996 ist sie auch für Erwachsene integrativer Bestandteil am Universitätsklinikum Jena (UKJ).

### 2.6.2 Gewinnung von peripheren Blutstammzellen

Das Prinzip der PBSZT besteht in der Gewinnung und anschließenden Transplantation von gesunden hämatopoetischen Stammzellen (SZ). Die SZ werden mittels Stammzellapherese aus dem Blut nach vier bis fünf Tage vorangegangener Stimulation mit Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) gewonnen und bis zur Transfusion (TF) in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Durch G-CSF wird das Knochenmark des Spenders zur intensiven Bildung von SZ und deren anschließender Ausschwemmung ins Blut angeregt.

**Tabelle 6** Spenderauswahl bei hämatopoetischer Stammzelltransplantation.

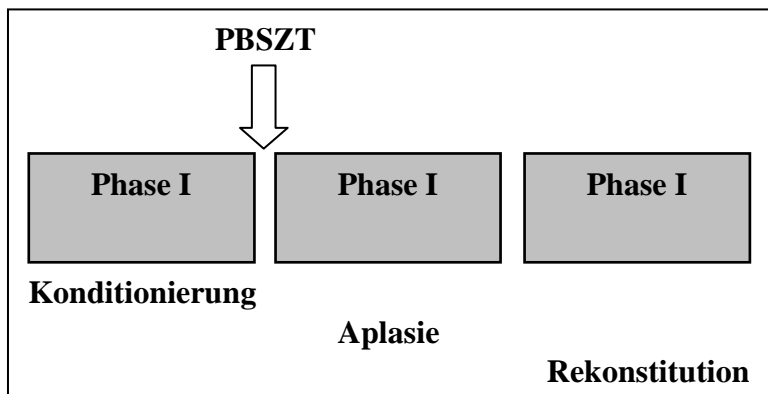
Syngene Transplantation	Allogene Transplantation (immun genetisch fremd)	Autologe Transplantation
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eineiiges Zwillingsgeschwister als Spender</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HLA-identische Geschwister</li> <li>• HLA-haploidentisches Familienmitglied:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ phänotypisch HLA-identisch</li> <li>○ mit Unterschieden in einem HLA-Haplotyp in Richtung der Abstoßung oder der GvH-Reaktion (in einem HLA-Antigen, A, B oder D; in zwei oder drei HLA-Antigenen)</li> </ul> </li> <li>• Unverwandter, HLA-identischer Spender</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entnahme eigener Blutstammzellen während der Remission und Reinfusion nach myelosuppressiver Vorbehandlung</li> </ul>

Die gewonnene Suspension gesunder mobilisierter Spenderstammzellen (das sogenannte Apheresat) enthält auch reifere Vorstufen der Zelllinien und zusätzlich Lymphozyten. Dabei

kann sowohl der Patient selbst (autolog) als auch ein gesunder (un)verwandter Proband (allogen) oder in seltenen Fällen auch ein eineiiges Zwillingsgeschwister (syngen) als Spender der SZ in Frage kommen (siehe Tab. 6).

### 2.6.3 Spenderauswahl und Transplantation

In der Abbildung 5 ist vereinfacht der Ablauf einer PBSZT dargestellt.



**Abbildung 5** Ablauf einer PBSZT.

Im Falle einer autologen PBSZT werden dem Patienten im Stadium der Remission, dass heißt einem zytostatika- und/oder strahlungstherapiebedingten Absinken der Tumorzellen im Knochenmark, SZ entnommen und mithilfe von Antikörpern von den Tumorzellen separiert (Purging) und nach wiederholter myelosuppressiver (knochenmarkunterdrückender) Therapie reinfundiert (Konsolidierungstherapie). Hierbei dient die Transplantation der SZ primär der Regeneration der Hämatopoese nach Hochdosischemotherapie.

Die syngene PBSZT ähnelt der autologen, da hier ebenfalls Spender (Zwillingsgeschwister des Empfängers) und Empfänger genetisch identisch sind. Infolge der Übertragung HLA-identischer Stammzellen führen diese beiden Therapien in aller Regel nicht zu Abstoßungsreaktionen sondern nur in seltenen Fällen (Tokime et al. 2000).

Die Bedeutung der allogenen PBSZT beruht neben der Regeneration der Hämatopoese vor allem auch in der Übertragung eines neuen Immunsystems (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen) und einer dadurch bedingten Immunreaktion des Transplantats gegen den Empfänger (siehe Kapitel 2.5.6).

Deshalb ist Gewebekompatibilität die Voraussetzung für eine allogene Transplantation, da es sich um einen immungenetisch nicht identischen Spender handelt. Sie wird in Familien (verwandt) - und Fremd (unverwandt) -PBSZT unterschieden. 30% der Patienten finden einen geeigneten verwandten Spender. Die verbleibenden Patienten sind auf einen möglichst

HLA-identischen Fremdspender aus einer der vielen internationalen Spenderregister angewiesen. Weltweit sind insgesamt 15.187.783 und davon in Deutschland 4.031.691 freiwillige Spender registriert und HLA-typisiert (Zentrales-Knochenmarkspender-Register-Deutschland 2010, ZKRD, Stand 23./28.11.2010). Trotz dieser hohen Anzahl ist die Wahrscheinlichkeit einen passenden nichtverwandten Spender zu finden ein kostenintensiver und sehr zeitaufwändiger Prozess und wird maßgeblich von der Häufigkeit des HLA-Typs des Patienten beeinflusst (Tiercy et al. 2007). Sobald ein passender Spender ermittelt, dessen SZ gewonnen und das Knochenmark des Patienten durch eine ärztlich (adäquat zur Erkrankung) ausgewählte Vorbehandlung (Konditionierung) mit Zytostatikatherapie und/oder Bestrahlung vollständig (myeloablativ) oder zumindest nahezu zerstört wurde (myelosuppressiv), erfolgt die PBSZT durch intravenöse Infusion der SZ.

#### **2.6.4 Zytostatika und Aplasiephase, sowie Blutbildung (Hämatopoese)**

Im Rahmen einer PBSZT bei hämatopoetischen Erkrankungen werden verschiedene Zytostatika vor und nach der Transplantation angewandt. Die antineoplastisch und immunsuppressiv wirkende Vorbehandlung (Konditionierung), bestehend aus sehr intensiver Zytostatika- und/oder Strahlentherapie, wird unmittelbar vor der Transplantation durchgeführt, um direkt vor PBSZT eine Remission zu erreichen. Eine im Anschluss eventuell auftretende GvHR bzw. GvHK wird mittels Immunsuppressiva eingedämmt.

Das gewählte Therapieschema wird von ärztlicher Seite anhand der Grunderkrankung und etwaiger Nebendiagnosen und/oder Komorbiditäten festgelegt. Speziell für die Konditionierung werden in der Regel validierte Studienprotokolle verwendet. Die eingesetzten Zytostatika haben durchschnittlich eine kurze Halbwertszeit (HWZ), sodass eine schnelle Elimination gewährleistet ist, sofern keine relevanten Stoffwechseleinschränkungen, z.B. der Leber oder der Nieren vorliegen. Dies ist für die unmittelbar sich anschließende Transplantation notwendig, um die künftige zelluläre Integrität der SZ im Empfängerorganismus nicht zu gefährden.

Im Anschluss an die Konditionierung wird das Apheresat Patienten mit gestörter Blutbildung (Hämatopoese) transfundiert. Dort siedeln sie sich in den Knochenmarksräumen an und übernehmen nach Proliferation und Differenzierung die Hämatopoese des Patienten bereits nach etwa zwei bis drei Wochen. Während dieses Zeitraumes unmittelbar nach der Transplantation werden die Blutwerte des Patienten aufgrund der kurzzeitig fehlenden Hämatopoese schlechter. Besonders die sich schnell regenerierenden Zelllinien, wie

Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten, sinken deutlich ab. Letztere sind für einige Tage überhaupt nicht mehr nachweisbar (schwere Neutropenie). Diese Phase wird als Aplasiephase bezeichnet und bedeutet definitionsgemäß ein Absinken der weißen Blutkörperchen (Leukozyten unter  $1000/\mu\text{l}$ , neutrophile Granulozyten unter  $500/\mu\text{l}$ ). Zur Bestimmung und Bewertung der Aplasiephase werden neben der notwendigen Leukozytenzahl vereinzelt auch der Hämoglobinwert ( $<7,5 \text{ g/dl}$ ) und die Thrombozytenzahl ( $<30 \times 10^9/\text{l}$ ) mit herangezogen. In dieser Phase sind spezielle Vorsichtsmaßnahmen für die Patienten zu treffen, da sie hochgradig infektiös- und blutungsgefährdet sind (siehe Tab. 7).

**Tabelle 7** Vorsichtsmaßnahmen am Patienten während der Aplasiephase.

- tägliche Blutabnahme bis zur Erholung des Blutbildes und entsprechend prophylaktische bzw. therapeutische TF von Thrombozyten und/oder Erythrozyten gemäß den Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008, siehe Kapitel 2.6 intensive Krankenbeobachtung und Versorgung des Patienten nach Pflegestandards für Patienten in Aplasie
- Schutz vor Infektionen mit Bakterien, Viren und Pilzen durch z.B.
  - prophylaktische Gabe von Antibiotika
  - Isolation im Einzelzimmer oder in einer speziellen Einheit zum Schutz vor der Übertragung von Infektionen von außen
  - Haut- und Schleimhautpflege, vor allem an Kathetereintrittsstellen, und tgl. Inspektion der Mundschleimhaut und Mundspülungen sowie eine sorgfältige antimikrobielle Dekontamination schützen ihn vor Infektionen mit Erregern, die er mitbringt
  - spezieller Ernährungsplan
  - keine Pflanzen im Patientenzimmer
  - Besuche nach Rücksprache
  - etc.

Des Weiteren sollte auf Symptome wie z.B. Temperaturanstieg, Übelkeit, Appetitlosigkeit, Schwindel, Schwäche und/oder Angst geachtet und adäquat darauf reagiert werden.

### **2.6.5 Auszug zur speziellen Immunsuppression mit Antithymozyten-Globulin (ATG) bzw. Antilymphozyten-Globulin (ALG)**

In diesem Abschnitt soll speziell auf zwei Immunsuppressiva, das Antithymozyten-Globulin (ATG) und das Antilymphozyten-Globulin (ALG) und deren mögliche Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion eingegangen werden.

Diese immunsuppressiv wirkenden Medikamente sind ein Konglomerat polyklonaler Antikörper (AK). Sie werden durch Reinigung der Sera von zuvor gegen menschliche Thymozyten, Lymphozyten, B- oder T-Lymphoblasten immunisierte Kaninchen oder Pferden gewonnen. Die gewonnenen polyklonalen Gammaglobulinfraktionen der ATG-

Chargen unterscheiden sich jedoch von Hersteller zu Hersteller und selbst von Charge zu Charge eines Herstellers (Smith et al. 1985).

ATG und ALG werden in der Literatur häufig synonym gebraucht, divergieren allerdings in ihrer Wirkungsspezifität. ATG reagiert vorwiegend gegen T-Zellen und ALG praktisch mit allen Lymphozyten. In dieser Arbeit wurde ebenfalls keine Differenzierung vorgenommen, da überwiegend ATG als Immunsuppressivum zum Einsatz kam.

Die AK binden sich spezifisch an spezielle membrangebundene Glykoproteine, vorwiegend von Lymphozyten, an die sogenannten „Clusters of Differentiation“ (CD), wie z.B. CD 11, CD 18 und CD62L (Beiras-Fernandez et al. 2005, Rebellato et al. 1994), reagieren aber nicht spezifisch gegen Leukozyten sondern ebenfalls auch mit anderen Zellreihen, welche adäquate Antigenmuster aufweisen. Diese AK-Bindung aktiviert durch den Fc-Komplex der AK u. a. natürliche Killerzellen (NK-Zellen), welche die Zerstörung der AK markierten Lymphozyten induzieren, die sogenannte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. antibody dependent cell cytotoxicity [ADCC] Muller et al. 1987). Außerdem scheint eine Inhibition (Teramura et al. 1997), eine komplementvermittelte Zytolyse (Taniguchi et al. 1990), Opsonierung mit anschließender Phagozytose, eine direkt toxische Wirkung oder die Induktion der Apoptose (Dubey et al. 2002) auf die Lymphozyten von Bedeutung zu sein. Resultierend wird durch diese Reaktionen eine sehr schnelle und massive Depletion der peripheren Blutlymphozyten (Agha et al. 2002, Genestier et al. 1998, Guttman et al. 1997, Bonnefoy-Berard und Revillard 1996, Rebellato et al. 1994) während des gesamten Behandlungszeitraumes erreicht. Diese sogenannte Lymphopenie ist ursächlich für die immunsuppressive Wirkung von ATG bzw. ALG, da andernfalls Lymphozyten eine zellulär vermittelte Immunreaktion (GvHR) bei PBSZT bewirken können (siehe Kapitel 2.7.2).

Thrombozyten exprimieren ebenfalls CD auf ihrer Zytoplasmamembran, wie z.B. CD41, CD42, CD62P und CD107a (Beiras-Fernandez et al. 2005). ATG bzw. ALG scheinen nicht direkt eine zytotoxische Wirkung auf PLT zu besitzen, induzieren aber die Expression bestimmter Adhäsionsproteine und aktivieren dadurch ruhende Thrombozyten (Beiras-Fernandez et al. 2005), was einen vermehrten Verbrauch und bei Vorliegen einer PBSZT-bedingten Bildungsstörung folglich eine Thrombozytopenie nach sich zieht.

In der Hämato-Onkologie wird ATG bzw. ALG neben der immunsuppressiven Anwendung z.B. auch bei der aplastischen Anämie (AA) und dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) als weiterer kurativer Therapieversuch eingesetzt, wenn keine Stammzelltransplantation durchgeführt werden kann (Frickhofen et al. 2003, Paquette 2002, Bacigalupo et al. 2000, Frickhofen und Rosenfeld 2000, Marsh et al. 1999, Bacigalupo et al. 1995, Rosenfeld et al. 1995b, Frickhofen et al. 1991).

### **2.6.6 Komplikation versus Vorteil einer allogenen PBSZT**

Neben den benötigten CD34-positiven SZ werden auch Leukozyten (T-Lymphozyten) aus dem Blut des Spenders extrahiert. Diese sind bei einer allogenen PBSZT, vor allem bei nicht-HLA-identischen Spendern, für eine unerwünschte Immunreaktion, die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Reaktion [GvHR]), verantwortlich (siehe Kapitel 2.7.2). Andererseits können sie auch aktiv noch vorhandene Leukämiezellen bzw. allgemein maligne Zellen im Empfängerorganismus bekämpfen, die noch im Körper des Patienten verblieben sind (sogenannte Graft versus Leukämie/Malignität, engl. graft versus leukemia/malignancy [GvL oder GvM]). So können sie zu einer Remission (Collins et al. 1997, Kolb et al. 1995, Kolb et al. 1990) mit Verringerung der Rezidivhäufigkeit und Verlängerung des Gesamtüberlebens führen. Dieser schon seit längerem bekannte und bestätigte Effekt wird auch zur Rezidivtherapie genutzt, indem Patienten Spenderleukozyten transfundiert werden (Donor-Lymphozyten-Infusionen [DLI]). (Bacigalupo et al. 1997, Slavin et al. 1996, Porter et al. 1994, van Rhee et al. 1994, Bar et al. 1993, Helg et al. 1993, Hertenstein et al. 1993). Für diese erwünschten Immunreaktionen sind vor allem die CD56+/CD3-NK-Zellen (Natürliche Killerzellen [NK]) des Spenders verantwortlich, welche in der Lage sind, Krebszellen auch ohne spezifische Antigenerkennung zu lysieren (Robertson und Ritz 1990). Weiterhin vermitteln auch zytotoxische T-Zellen (CTL), auch CD8+-Zellen genannt (veraltete Bezeichnung: T-Killerzellen), GvL Aktivität (Zhang et al. 2007). Dieser GvL-Effekt einer allogenen PBSZT bietet den Vorteil, dass eine non (nicht)-myeloablative-Konditionierung im Vorfeld der Transplantation verwendet werden kann und ermöglicht somit den Einsatz dieser Therapie auch für ältere Patienten bis zum 70. Lebensjahr bzw. jüngeren mit zusätzlicher Komorbidität (Dalgaard et al. 2007) aufgrund der geringeren therapieassoziierten Mortalität.

### **2.6.7 Indikation der PBSZT**

Die Indikation einer autologen PBSZT wird durchschnittlich häufiger gestellt als die einer allogenen PBSZT. Vorwiegend kommt sie bei malignen Lymphomen und den Plasmozytomen zum Einsatz. Eine allogene PBSZT kann indiziert sein bei seltenen Formen sowie bei Rezidiven lymphoplastischer oder myeloischer Leukämien, bei schweren angeborenen Immundefekterkrankungen sowie bei erworbenen oder hereditären Störungen der Hämatopoese (siehe Tab. 8).



**Tabelle 8** Indikationen zur hämatopoetischen PBSZT (nach Marks und Finke 2006).

<b>hämatologische maligne Erkrankung</b>	<b>Stadium</b>	<b>allogene PBSZT</b>	<b>autologe PBSZT</b>
<b>akute myeloische Leukämie</b>	CR1 Standardrisiko	x	x
	CR1 Hochrisiko	x	(x)
	CR1 Niedriges Risiko	(x)	x
	CR2+	x	x
	Induktionsversagen, Rezidiv	x	0
<b>akute lymphatische Leukämie</b>	CR1 Standardrisiko	(x)	(x)
	CR1 Hochrisiko	x	(x)
	CR2+	x	(x)
	Induktionsversagen, Rezidiv	x	0
<b>myelodysplastisches Syndrom</b>	RA, RARS	x	(x)
	RAEB I+II, sekundäre AML, CMMoL	x	0
<b>chronisch myeloische Leukämie</b>	chronische Phase	x	(x)
	Akzeleration, Blastenkrise	x	0
<b>Osteomyelofibrose</b>	Progress	x	0
<b>M. Hodgkin</b>	CR1	0	0
	CR2+	(x)	x
<b>hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom</b>	Hochrisiko, CR1	(x)	x
	chemosensibles Rezidiv	(x)	x
<b>follikuläres Lymphom</b>	CR1	0	(x)
	chemosensibles Rezidiv	(x)	x
<b>Mantelzelllymphom</b>	CR1	(x)	x
	chemosensibles Rezidiv	x	x
<b>Plasmozytom</b>	Standardrisiko	(x)	x
	Hochrisiko	x	x
<b>chronisch lymphatische Leukämie</b>	CR2+, Rezidiv	(x)	(x)

CR1 Erste komplette Remission; CR2+ zweite oder folgende komplette Remission; RA refraktäre Anämie; RARS refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten; RAEB refraktäre Anämie mit Blastenexzess; AML akute myeloische Leukämie; CMMoL chronisch myelomonozytäre Leukämie. 0 keine Indikation; x Indikation; (x) Indikation im Rahmen von Studien.

Zusammenfassend regenerieren SZ nicht nur innerhalb von zwei bis vier Wochen die physiologische Hämatopoese, sondern zerstören mittels der transfundierten und sich aus den transplantierten Blutstammzellen entwickelnden neuen Immunzellen beim Patienten eventuell noch vorhandene bösartige Tumor-Zellen.

## 2.7 Thrombozytentransfusion bei hämatologisch-onkologischen Patienten

### 2.7.1 Allgemeines

Der Bedarf an TK, besonders der Einsatz in der Hämato-Onkologie stieg, in den letzten Jahren stetig an. Am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurden in den Jahren 2006 bis 2009 durchschnittlich circa 7675 TAK pro Jahr transfundiert (Statistik ITM 2006-

2009). Davon benötigten die hämatologisch-onkologischen Stationen, inklusive Tagesklinik und Ambulanz, durchschnittlich 50% des Gesamtverbrauches an TAK (siehe Tab. 9). Dies unterstreicht allgemein als auch besonders für diesen klinischen Bereich die Bedeutung der TAK-PLT.

**Tabelle 9** Darstellung der Statistik TAK der Universitätsklinik der FSU Jena.

<b>Jahr</b>	<b>2006</b>		<b>2007</b>		<b>2008</b>		<b>2009</b>	
<b>TAK der Bereiche</b>	Gesamt	in %	Gesamt	in %	Gesamt	in %	Gesamt	in %
<b>Gesamtverbrauch</b>	<b>8285</b>	100	<b>7538</b>	100	<b>8270</b>	100	<b>6606</b>	100
<b>KMT/PBSZT*</b>	1042	13	917	12	947	11	736	11
<b>Hämato-Onkologie</b>	1996	24	1735	23	2216	27	1873	28
<b>Tagesklinik*</b>	1121	14	926	12	774	9	497	8
<b>Kinderklinik</b>	848	10	473	6	556	7	692	10
<b>andere Stationen</b>	752	9	795	11	672	8	276	4
<b>ITS/NHZ*</b>	1328	16	1472	20	1615	20	1445	22
<b>operativer Bereich</b>	752	9	792	11	853	10	484	7
<b>Sonstige</b>	446	5	428	6	637	8	603	9

\*Hämatolo-Onkologie; KMT Knochenmarktransplantation; PBSZT Periphere Blutstammzelltransplantation; ITS Intensivstationen; NHZ Nothilfezentrum.

Heute sind prophylaktische und therapeutische TF zur Behandlung thrombozytopenischer Blutungen ein unverzichtbarer Bestandteil der Routinetherapie der Stammzelltransplantation bei malignen und nicht-malignen Erkrankungen sowie einer intensiven zytostatischen Behandlung. Eine thrombozytopenisch bedingte hämorrhagische Blutung (therapeutische Indikation) sowie die Prophylaxe vor operativen Eingriffen bei Patienten mit hereditären Thrombozytopathien indizieren eine TF funktionsfähiger PLT. Sie ist momentan die effektivste Therapiemethode (Scharf et al. 1999). Im Rahmen von hyporegenerativen Thrombozytopenien (primäre oder durch Zytostatika bedingte sekundäre Knochenmarkaplasien) oder einer Verdünnungssthembozytopenie (Dilution) bei Massivtransfusionen sind in bestimmten Situationen auch ohne aktuelle Blutungen prophylaktische TF bei Absinken der PLT unter bestimmte Grenzwerte sinnvoll. Da derzeit nur eine beschränkte Anzahl randomisierter klinischer Studien für Fragestellungen zur TF vorliegt (Stanworth et al. 2004), wurden verschiedene Guidelines zur Anwendung und Therapie von TK publiziert. Die folgende Tabelle (Tab. 10) soll einen Einblick in die Guidelines zur PLT-TF in den Ländern Großbritannien, Frankreich und Deutschland geben und gleichfalls Unterschiede deutlich machen. Die Indikationsstellung zur TF ist abhängig von Thrombozytenzahl und -funktion, der Blutungssymptomatik (nach WHO: Grad 1, kleinere Hämatome, Petechien, Zahnfleischbluten; Grad 2, kleinere Blutungen, die keine TF von Erythrozytenkonzentraten (EK) erfordern; Grad 3, transfusionsbedürftige Blutungen;

Grad 4, organ- oder lebensbedrohliche Blutungen), dem Blutungsrisiko sowie der Grunderkrankung (Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008).

**Tabelle 10** Transfusionsempfehlungen und Kontraindikationen für TK anhand der Thrombozytenzahl (PLT/L) bei hämatologisch-onkologischen Patienten, nach Fontano 2007).

<b>Guideline</b>	<b>Großbritannien</b> British Committee for Standards in Haematology 2003	<b>Frankreich</b> Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé 2003	<b>Deutschland</b> Querschnitts- Leitlinien der Bundesärztekammer 2008
<b>Patienten mit Knochenmarkinsuffizienz:</b> <i>Ohne Risikofaktoren</i>	5–10x10 <sup>9</sup> /L, nur therapeutisch bei chronisch stabiler Thrombozytopenie	10x10 <sup>9</sup> /L, nur therapeutisch bei chronisch stabiler Thrombozytopenie	10x10 <sup>9</sup> /L , 5x10 <sup>9</sup> /L bei chronisch stabiler Thrombozytopenie
<b>Patienten mit Knochenmarkinsuffizienz:</b> <i>mit Risikofaktoren:</i>	20x10 <sup>9</sup> /L	20x10 <sup>9</sup> /L	10x10 <sup>9</sup> /L bei chronisch stabiler Thrombozytopenie, 20x10 <sup>9</sup> /L
	Sepsis, Antibiotika, Hämostasestörungen	Fieber, Infektion, arterielle Hypertonie, schneller Thrombozytenabfall, Mukositis, sonstige Läsion mit Blutungspotential	Fieber über 38°C, Infektionen, Komplikationen (GvHK), klinische Blutungszeichen (z.B. petechiale Blutungen), TAH, plasmatische Gerinnungsstörung, Leukozytose, schneller Thrombozytenabfall, vorbestehende Nekrosebereiche
<b>Koagulopathie, Antikoagulantien</b>	20x10 <sup>9</sup> /L	50x10 <sup>9</sup> /L	20x10 <sup>9</sup> /L
<b>therapeutisch (bei aktiver Blutung)</b>	Nach klinischem Bild	Nach klinischem Bild	<100x10 <sup>9</sup> /L, falls transfusionspflichtig
<b>bei Thrombozytopathie</b>	Nach klinischem Bild	Nach klinischem Bild	Nach klinischem Bild
<b>bei Thrombozytenverbrauch</b>	Nach klinischem Bild	Nach klinischem Bild	Nach klinischem Bild (bei Massenblutung <100x10 <sup>9</sup> /L)
<b>disseminierte intravasale Gerinnung</b>	Akut: 50x10 <sup>9</sup> /L Chronisch: nur bei Blutung	Nur bei Blutung und Ursache nicht korrigierbar, 50 bei akuter Leukämie	Nur bei Blutung
<b>Kontraindikationen*</b>	TTP, HIT	TTP, HIT, PTP	TTP, HIT

\*Thrombozytentransfusion erlaubt bei lebensbedrohlicher Blutung; TAH–Thrombozytenaggregationshemmer; TTP–thrombotisch-thrombozytopenische Purpura; HIT–heparininduzierte Thrombozytopenie; PTP–Posttransfusionspurpura

Die Indikation zur prophylaktischen TK-Gabe bei Patienten ohne akute Blutung wird differenziert betrachtet: Ohne Risikofaktoren (Tab. 10) gilt eine Plättchenzahl von 10/nl Blut

als ausreichend, da erst unterhalb dieses Wertes die Gefahr transfusionspflichtiger Blutungen sich stark zu erhöhen scheint (Callow et al. 2002, Rebulla et al. 1997, Gmur et al. 1991) und somit eine TF indiziert ist (Chawla und Hinberg 1991). Ausnahme bilden Patienten bei chronisch stabiler Thrombozytopenie, wo ein TF-Trigger von weniger als 5 PLT/nl Blut zählt. Wenn Risikofaktoren vorhanden sind, sollte eine Plättchenzahl von 20/nl Blut angestrebt werden (Norfolk et al. 1998).

TK sind nach Möglichkeit ABO-kompatibel zu übertragen (siehe Tab. 11). Der Rhesusfaktor D sollte vor allem bei rhesusnegativen Mädchen bzw. gebärfähigen Frauen berücksichtigt werden, um einer eventuellen Immunisierung vorzubeugen. Weiterhin sollte bei Alloimmunisierung gegen plättchenspezifische- und/oder HLA-Antigene, HLA-angepasste TAK transfundiert werden. Präventiv sollte dies auf jeden Fall bei Patienten mit lebenslanger Hämotherapienotwendigkeit durchgeführt werden (Coller 2001, Clemetson und Scharf 1999, Scharf et al. 1999, Scharf und Giers 1998).

**Tabelle 11** ABO-kompatible Thrombozytentransfusion.

Patient	Kompatible TK
A	A oder 0
B	B oder 0
AB	AB, A, B oder 0
0	0

Zur Vermeidung einer GvHR sind bestrahlte TK anzuwenden (British Committee for Standards in Haematology 2003, Norfolk et al. 1998) und CMV-AK-negative Präparate sollten folgende, diesbezüglich gefährdete Patienten erhalten (Reesink et al. 2002); siehe Tab. 12.

**Tabelle 12** Vermeidung von CMV-Infektionen, nach den Richtlinien der Bundesärztekammer 2006 und Änderungen und Ergänzungen 2008.

- Feten (intrauterine Transfusion)
  - Frühgeborene
  - Empfänger eines allogenen Stammzellpräparates
  - Empfänger mit schweren angeborenen Immundefekten (SCID)
  - CMV-negative, HIV-infizierte Patienten
  - CMV-negative, schwangere Frauen
- Im Notfall und bei Versorgungsschwierigkeiten können ausschließlich leukozytendepletierte Präparate transfundiert werden.

## **2.7.2 Spezielle Indikationen für Patienten mit akuter Thrombozytenbildungsstörung nach Hochdosischemotherapie im Kontext einer Stammzelltransplantation**

Die Thrombozyten-Arbeitsgruppe der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI), der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH) und der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V. (DGHO) und die Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008 empfehlen anhand von Untersuchungen vorwiegend bei Patienten mit akuter Leukämie (Stanworth et al. 2004, Zumberg et al. 2002, Wandt et al. 2001) prophylaktische TK-TF bei Erwachsenen mit krankheits- oder therapiebedingter passagerer Thrombozytopenie nach Chemo-/Strahlentherapie ab einem Richtwert von  $\leq 10$  PLT/nl, sofern keine blutungsrelevanten Risikofaktoren (Tab. 10) vorliegen (Greinacher et al. 2006). Leider gibt es nur wenige Studien zur prophylaktischen PLT-TF bei Patienten mit PBSZT/KMT. Bei Patienten mit PBSZT/KMT ohne Risikofaktoren, wie z.B. GvHK, Mukositis oder Zystitis, wird von Greinacher et al. 2006 ebenfalls eine Plättchenzahl von  $\leq 10$  PLT/nl Blut als Richtgröße für prophylaktische TK-TF empfohlen, da dieser Wert ausreichend scheint (Wandt et al. 2006, Heal und Blumberg 2004, Tinmouth et al. 2004, Lawrence et al. 2001, Navarro et al. 1998, Wandt et al. 1998, Heckman et al. 1997, Rebulla et al. 1997). Sobald jedoch thrombozytopenische Patienten Risikofaktoren besitzen, wird ein Trigger von 20 PLT/nl Blut für prophylaktische TF empfohlen.

Abschließend erwähnt, sollten Patienten mit bevorstehender allogener PBSZT/KMT zum Schutz vor einer möglichen Immunisierung keine Blutprodukte von Blutsverwandten und/oder des Transplantatspenders bzw. dessen Blutsverwandten erhalten.

## **2.8 Produktion, Lagerung und Qualitätssicherung von TK**

### **2.8.1 Produktion und Lagerung**

Die Gewinnung von TK ist entweder durch maschinelle Thrombozytapherese oder durch Herstellung von Poolpräparaten aus Vollbluteinzelspenden möglich. Im Institut für Transfusionsmedizin Jena findet ausschließlich die Herstellung von TAK mit integrierter Leukozytendepletion Anwendung, da hierbei eine bessere und gleichbleibende Qualität und ein extrem niedriges Infektionsrisiko gesichert sind. Durchschnittlich enthält *ein* TAK (Einheit) eines Einzelspenders 2 bis  $4 \times 10^{11}$  PLT, welche in ca. 200 bis 300ml Plasma

suspendiert vorliegen. Als leukozytendepletiert gelten Präparate mit einem Leukozytengehalt kleiner als  $1 \times 10^6$  bzw.  $4/\mu\text{l}$ , was bei Nutzung aktueller Apherese- und Leukozytendepletionsverfahren erreichbar ist (Moog und Muller 1999). Weiterhin sind geringe Mengen an Erythrozyten enthalten ( $<3 \times 10^9$ ). Die Produktion der verwendeten TAK erfolgte mit dem Verfahren der „continuous flow centrifugation“ (CFC) der CaridianBCT® (vormals Trima Gambro BCT). Anschließend dürfen die TAK, seit dem 09. Juni. 2008 (Votum 38, Arbeitskreis Blut des Robert-Koch-Institutes, 2008), 4 Tage (4 x 24 Stunden), gerechnet ab Mitternacht des Entnahmetages, aufbewahrt werden, bzw. muss innerhalb dieser Frist die TF erfolgen. Moroff und Holme 1991 fanden bei Herstellung in einem funktionell geschlossenem System, Lagerung bei gleichbleibender Temperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und unter ständiger Agitation kaum nennenswerte Qualitätseinbußen.

### **2.8.2 Bestrahlung von TK zur Prophylaxe der Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR)**

Eine seltene Komplikation transfusionsassoziiierter Reaktionen ist die GvHR. Sie kann bei immuninkompetenten Patienten, beispielweise im Rahmen einer PBSZT/KMT oder selten auch bei kompatibler HLA (Haupt-Histokompatibilitäts-Antigene) -Konstellation (z.B. Blutsverwandtschaft) ohne Immunsuppression auftreten. Deshalb müssen entsprechend den Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008 zellhaltige Blutprodukte vor Ausgabe an solche Patienten prophylaktisch mit einer Dosis von 30 Gray (Gy) bestrahlt werden, damit eine GvHR zuverlässig verhindert werden kann (Moroff und Luban 1997). Durch Bestrahlung wird die Vermehrung transfundierter Lymphozyten beim Empfänger und damit eine transfusionsassoziierte GvHR verhindert. An keiner Stelle des Präparates darf die Erfolgsdosis 25 Gy unterschreiten. Die Indikationen für eine Bestrahlung von TK sind in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13** Indikationen für die Bestrahlung von TK, nach den Richtlinien der Bundesärztekammer 2006 und Änderungen und Ergänzungen 2008.

- alle Blutkomponenten aus gerichteten Blutspenden von Blutsverwandten
- alle HLA-ausgewählten Blutkomponenten
- alle Granulozytenpräparate
- Blutkomponenten für die**
- intrauterine Transfusion
- postpartale Austauschtransfusion\*
- Transfusion von Frühgeborenen (bis zur Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche)
- Transfusion von Neugeborenen bei Verdacht auf Immundefizienz
- Transfusion bei allogener Stammzell-/Knochenmarktransplantation
- Transfusion (7 – 14 Tage) vor autologer Blutstammzellentnahme
- Transfusion bei autologer Stammzell-/Knochenmarktransplantation (ca. 3 Monate nach Transplantation)
- Transfusion bei schwerem Immundefektsyndrom oder Patienten mit AIDS
- Transfusion bei M. Hodgkin (alle Stadien)
- Therapie mit Purin-Analoga (Fludarabin, Cladribin, Deoxycoformycin)
- Therapie mit Anti-T-Lymphozyten-Antikörpern (Alemtuzumab, ATG/ALG)
- Transfusion bei Hochdosis-Chemotherapie bei Leukämien, malignen Lymphomen und soliden Tumoren\*

\*nicht gesicherte Indikationen.

(Diese Auflistung ist der Entwicklung neuer immunsuppressiver Medikamente/Maßnahmen anzupassen.)

Eine GvHK ist Folge einer immunologischen Reaktion des Spender- (engl. Donor) Transplantats (engl. Graft) gegen Zelloberflächenproteine, sogenannte Humane Leukozyten-Antigene (engl. Human Leukocyte Antigens [HLA]) des Empfängers (engl. Host). Physiologisch sind die HLA-Antigene auf der Zelloberfläche exprimierte Moleküle aller Körperzellen, die den T-Lymphozyten antigene Peptide präsentieren und auf diese Weise die Immunantwort gegen entzündliche und maligne Prozesse modulieren sollen. Nach einer TF sind die übertragenen T-Lymphozyten gegen die fremden differenten HLA-Antigene gerichtet und können zu einer Schädigung der Haut (makulopapulöses Exanthem, Erythrodermie), der Mundschleimhaut (Mukositis), des Darms (Enteritis mit schwerer Diarrhoe) und der Leber (Hepatitis) führen. Wenn die GvHR Krankheitswert bekommt, spricht man von Graft-versus-Host Krankheit (GvHK). Man unterscheidet die akute GvHK in unterschiedlichen Schweregraden (Grad 1-4) von der chronischen GvHK (begrenzte und ausgedehnte Form). Die akute Form tritt innerhalb 100 Tage nach Transplantation auf und ist meist Folge einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (Jacobsohn und Vogelsang 2007). Später beobachtet man die chronische Form, welche sich häufig aus einer vorhergegangenen akuten GvHK entwickelt.

## 2.8.3 Qualitätssicherung und Bestimmungen

### 2.8.3.1 Qualitätssicherung von TAK

Vor jeder Thrombozytapherese ist die Spendetauglichkeit durch einen entsprechend qualifizierten Arzt/Ärztin mittels Anamnese, orientierende körperliche Untersuchung und durch Laboratoriumsuntersuchungen zu prüfen. Insbesondere die Thrombozytenzahl muss  $\geq 150/\text{nl}$  Blut betragen. Die gewonnenen TAK sind im Sinne von § 2 Abs. 1 AMG und in Kombination mit § 2 Nr. 3 TFG Arzneimittel und unterliegen den Bestimmungen des Arzneimittelrechtes. Da sie als Blutprodukte im Voraus hergestellt und an Dritte weitergegeben (transfundiert) werden, gelten sie als Fertigarzneimittel und benötigen hierfür eine Zulassung nach §§ 21 ff. AMG durch die zuständige Bundesoberbehörde (Paul-Ehrlich-Institut); siehe Tab. 14.

**Tabelle 14** Qualitätskontrollen für leukozytendepletiertes TAK, nach Richtlinien der Bundesärztekammer 2006 und Änderungen und Ergänzungen 2008.

Prüfparameter	Prüfkriterium	Prüfzeitpunkt
<b>Volumen</b>	gemäß Zulassung	nach Herstellung
<b>Thrombozytengehalt</b>	$> 2 \times 10^{11}/\text{Einheit}^*$	nach Herstellung und am Ende der Haltbarkeit
<b>Thrombozyten/ml</b>	gemäß Zulassung	nach Herstellung
<b>Restleukozyten</b>	$< 1 \times 10^6/\text{Einheit}^{**}$	nach Herstellung
<b>Resterythrozyten</b>	$< 3 \times 10^9/\text{Einheit}$	nach Herstellung
<b>pH-Wert bei <math>22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}</math></b>	6,5 - 7,4	am Ende der Haltbarkeit
<b>visuelle Kontrolle</b>	Beutel unversehrt, „Swirling“, alle hergestellten Einheiten werden geprüft	alle hergestellten Einheiten werden am Ende der Haltbarkeit und vor Abgabe geprüft
<b>Sterilität</b>	steril	am Ende der Haltbarkeit

\*Der Thrombozytengehalt der von der Spezifikation abweichenden Präparate darf den unteren Grenzwert höchstens um 5% unterschreiten. \*\*Die Restleukozytenzahl der von der Spezifikation abweichenden Präparate darf  $1 \times 10^7$  pro Einheit nicht überschreiten.

Vor der Freigabe der TAK müssen entsprechende Laboruntersuchungen durchgeführt werden (siehe Tab. 15). Sofern Spenden nicht diesen Anforderungen entsprechen, müssen sie entsorgt werden.

Außer den in Tabelle 14 und 15 genannten Prüfparametern gibt es in Deutschland keine weiteren verbindlichen Vorschriften zur Testung der Plättchenfunktion in TAK. Allerdings wurde bereits von Hesse et al. 2001 im Rahmen einer Untersuchung des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI) zur „Beurteilung der Thrombozytenfunktion“ in TK verschiedener Labors die Anforderung erhoben, verbindliche und standardisierte in-vitro Funktionstests zu etablieren, um eine einheitliche Arzneimittelqualität in Deutschland zu gewährleisten. Empfohlene



Methoden sind z.B. die Bestimmung des pH-Wertes und die Durchflusszytometrie zur Ermittlung des P-Selektins (CD62P).

**Tabelle 15** Laboruntersuchungen vor Freigabe der Spende, nach Richtlinien der Bundesärztekammer 2006 und Änderungen und Ergänzungen 2008.

Parameter	Anforderungen
Blutgruppenbestimmung: AB0, Rhesusformel	bestimmt*
Anti-HIV-1/-2-Antikörper	negativ
Anti-HCV-Antikörper	negativ
HBs-Antigen	negativ
Anti-HBc	negativ**
HCV-Genom (NAT)	negativ
HIV-1-Genom (NAT)	negativ
Antikörper gegen <i>Treponema pallidum</i>	negativ
Antikörpersuchtest*	keine klinisch relevanten Antikörper nachweisbar

\* und \*\*Details siehe „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§12 u. 18 TFG; Änderungen und Ergänzungen 2007“ der BÄK, Abschnitt 2.4.2; \*\*\*Bei Blutspendern ist der Antikörpersuchtest bei der Eignungsuntersuchung und danach mindestens alle zwei Jahre sowie nach Schwangerschaften und Bluttransfusionen durchzuführen.

#### pH-Wert-Messung:

Djaldetti et al. 1979 wiesen nach, dass pH-Werte außerhalb der gültigen europäischen Richtlinien (Council of Europe Publishers 2007) von Werten zwischen 6,5 bis 7,4 zu Aggregation, Formveränderungen, und letztendlich zu irreversibler Schädigung der Thrombozyten führen.

#### Bestimmung des Oberflächenmarkers P-Selektin (CD62P):

Wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, wird das Membranglykoprotein CD62P in Abhängigkeit von der PLT-Aktivierung auf der Oberflächenmembran durch Verschmelzung der  $\alpha$ -Granula mit dem SCS exprimiert und im Verlauf proteolytisch abgebaut, sodass die Anzahl trotz Aktivierung wieder abnehmen kann (Rinder 1998). Demzufolge können PLT mit oberflächengebundenem CD62P entweder absolut intakt oder aber fast komplett degranuliert sein. Um den tatsächlichen Aktivierungsgrad der PLT durch z.B. Stimulationsversuche bestimmen zu können, ist es daher notwendig, ein sehr starkes Stimulans zu verwenden, um zu überprüfen, ob und wieviel CD62P noch in den  $\alpha$ -Granula gespeichert ist: Durch fluoreszenzmarkierte Antikörper (AK) kann dieser Oberflächenrezeptor im Durchflusszytometer mit und ohne Stimulation dargestellt werden. Zur vollständigen Degranulierung der PLT sind die Stimulantien PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) oder TRAP-6 (thrombin receptor-activating peptide) im Vergleich zu dem schwachen ADP (Adenosindiphosphat) besonders geeignet (Hesse et al. 2001). Die P-Selektinexpression

stellt somit einen Marker für die Degranulation von  $\alpha$ -Granula dar und lässt auf den aktuellen Funktionszustand der PLT schließen.

Weitere Methoden sind die Thrombozytenaggregation und die hypotone Schockresistenzmessung, welche hier allerdings nicht näher erläutert werden.

Kurze Erwähnung sollen noch die „original platelet testing guidelines“ der „U.S. Food and Drug Administration (FDA)“ finden, deren Qualitätsnachweis von PLT und TK vier Rubriken umfasst (U.S. FDA Guidance 1999):

1. die in vitro Bewertung der Plättchenfunktion und -biochemischen Eigenschaften,
2. das Überleben der transfundierten PLT in der Zirkulation,
3. die klinische hämostatische Effektivität und
4. die Bewertung der Plättchensubstitution.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Beurteilung von TK bislang sehr schwierig ist, da es nach wie vor an standardisierten Methoden zur Qualitätskontrolle mangelt.

### **2.8.3.2 Qualitätssicherung bestrahlter TK**

Die Qualitätskontrollen der bestrahlten TK sind identisch mit den Anforderungen der unbestrahlten TK. Lediglich die vorgesehenen Kontrollen am Ende der Haltbarkeit müssen am bestrahlten Präparat durchgeführt werden.

### **2.8.3.3 Qualitätssicherung der TK-Transfusion (TF)**

TK sind verschreibungspflichtige Arzneimittel und dürfen nur auf ärztliche Anordnung abgegeben werden. Die Indikation ist streng zu stellen (Richtlinien der Bundesärztekammer 2006). Sofern die PLT nicht aktiviert dem Spender entnommen und zügig transfundiert werden, können sie etwa 7 bis 10 Tage im Blut gesunder Empfänger nachgewiesen werden. Diese mittlere Plättchenüberlebenszeit nimmt durch lagerungsbedingte Alterungsprozesse ab (Murphy 1997) und ist bei Patienten mit gesteigertem Thrombozytenverbrauch (vor allem bei PLT-AK) und/oder Thrombozytopenien beträchtlich verkürzt.

Nach Möglichkeit sollte eine TK-TF zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung immer erst mit *einem* TK begonnen werden, wodurch bei einem Erwachsenen in der Regel ein Plättchenzahlanstieg von ungefähr 30/nl Blut erreichbar ist (Norfolk et al. 1998). Bleibt dieser PLT-Anstieg und damit das Überschreiten des PLT-Indikations-Triggers bei prophylaktischen TF aus, ist die Indikation zur Applikation weiterer Einheiten gegeben, um

einer möglichen Blutungsgefahr vorzubeugen. Der zu erwartende Thrombozytenanstieg zur Beurteilung der Wirksamkeit von TK wird mittels so genannter korrigierter Inkrementbestimmung (engl. corrected count increment [CCI]) 1 Stunde und/oder 20 bis 24 Stunden *nach* TK-Gabe wie folgt berechnet:

$$\text{Korrigiertes Inkrement} = \frac{\text{Inkrement (/nl)} * \times \text{Körperoberfläche (m}^2\text{)} *}{\text{Anzahl transfundierter PLT } (\times 10^{11})}$$

\*Empfänger

Des Weiteren findet die Bestimmung der Wiederfindungsrate (Recovery) in % Anwendung und berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Recovery [\%]} = \frac{\text{Inkrement (/nl)} * \times \text{Blutvolumen (l)} * \times 100}{\text{Anzahl transfundierter PLT } (\times 10^{11}) \times 0,67}$$

\*Empfänger

Darin bezieht sich der Korrekturfaktor 0,67 auf eine Wiederfindungsrate von 67% bei Normalprobanden 1 Stunde *nach* TF mit einer Thrombozytenüberlebenszeit von  $9,6 \pm 0,6$  Tagen. Um das Blutvolumen der Patienten zu errechnen, wurde die Formel nach Nadler (Lehner et al. 1981) verwendet:

#### **Blutvolumen für Männer in Liter:**

$$= 0,3669 \times [\text{Größe } (\text{m})^3] + 0,03219 \times \text{Körpergewicht } (\text{kg}) + 0,6041$$

#### **Blutvolumen für Frauen in Liter:**

$$= 0,3561 \times [\text{Größe } (\text{m})^3] + 0,03308 \times \text{Körpergewicht } (\text{kg}) + 0,1833$$

\*Empfänger, Größe in Meter; Körpergewicht in Kilogramm

Ein CCI von  $<7,5 \times 10^9$  PLT/l nach 1 Stunde oder  $<4,5 \times 10^9$  PLT/l nach 20 bis 24 Stunden wird als Transfusionsmisserfolg gesehen. (Norfolk et al. 1998). Ein klinischer Erfolg der Thrombozytentransfusion ist der Stillstand der Blutung nach therapeutischer Applikation. Zudem spielt die Milz als Thrombozytenspeicher (bis 30%) und die Recovery (Wiederfindungsrate) der transfundierten PLT im peripheren Blut eine entscheidende Rolle. Sie sollte zwischen 60 bis 70% betragen (Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008). Eine Milzvergrößerung (Splenomegalie) kann die Recovery im Gegensatz zur Milzentfernung (Splenektomie) um 15 bis 20% verringern (Novotny 1999) und tritt z.B. im Kontext von akuten und chronischen Leukämien und Lymphomen auf. Außerdem können z.B. Medikamentenwechselwirkungen, verschiedene Gerinnungserkrankungen (Koagulopathien) und immunologische Prozesse zu einem Transfusionsmisserfolg führen.

---

Zusammenfassend sollten laut Rinder et al. 2003 Thrombozyten innerhalb von 24 bis 48 Stunden übertragen werden, da diese normalerweise ein gutes CCI und eine gute Funktion aufweisen. Doch letztendlich ist der in vitro Qualitätsnachweis (Probe aus dem TK *vor* TF) von PLT *vor* TF noch immer sehr schwierig und ex vivo Testverfahren (Patientenblutprobe *nach* PLT-TF) transfundierter PLT werden zurzeit nicht routinemäßig eingesetzt. Diese Arbeit will unter kombinierter Verwendung von standardisierten in vitro und ex vivo Untersuchungsmethoden diesem Problem entgegenwirken.

### 3 Ziele der Arbeit

Die Qualität von TAK wird heute überwiegend durch metabolische Merkmale und deren Veränderung während der Lagerung beschrieben. Von großer klinisch-relevanter Bedeutung wäre aber ein Plättchenfunktionstest, welcher die tatsächliche Funktionalität von gelagerten TAK-PLT widerspiegelt. Aufgrund der immensen Kosten und der fehlenden Standardisierung solcher Tests finden sie derzeit im Routinebetrieb keine Anwendung oder sind nicht vergleichbar.

Eine mögliche *in vitro* Messung *vor* TF der potentiellen *in vivo* hämostatischen Effektivität von Thrombozyten im TAK und deren Restauration *nach* TF könnte die gegenwärtige Thrombozyten-TF-Praktik revolutionieren.

Das Ziel unserer Arbeit bestand darin, einen neuartigen *in-vitro* Plättchenadhäsionsassay (Platelet ADhesion Assay, PADA) heranzuziehen und zu beurteilen. Ein Test, der leicht, reproduzierbar und kostengünstig anwendbar ist und die aktuelle Funktion der PLT nicht nur im Vollblut, sondern auch in citrierten TK-Proben während der Lagerung mit und ohne Zusatz von Agonisten überprüft.

Auf drei wichtige Fragen sollte eine Antwort gefunden werden:

1. Wie verhält sich die Adhäsivität und damit die Qualität von TAK-PLT in Abhängigkeit ihrer verschiedenen Lagerungszeiten *vor* TF und selbiger PLT *nach* TF und im Vergleich zu ihrer Voraktivierung (CD62P)?
2. Sind die gelagerten TAK-PLT *vor* TF stimulierbar und ist eine *in vivo* Restauration ihrer Funktion *nach* TF zu erwarten?
3. Stellt der PADA eine geeignete Methode für die routinemäßige Qualitätskontrolle der TAK-PLT *vor* bzw. *nach* Transfusion dar?

## 4 Material und Methode

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte und Beutelsysteme

- Eppendorf Centrifuge 5810
- Abbott Cell-Dyn Ruby
- Terumo Sterile Tubing Welder, TSCD , SC 201 AH
- Minishaker MS2, IKA Works Inc. Wilmington, NC 28405 USA, modifiziert von der Firma HaemoSys GmbH Jena (konstante Schüttlergeschwindigkeit von 510 RPM [rotation per minute, Umdrehungen pro Minute] und definiertem Scherrstress 15 dynes/cm<sup>2</sup>)
- Vortex Schüttler, Modell VV2, Firma VWR International
- Pipetten: eppendorf Reference autoclavable, mit Pipetiervolumen von 50-200µl; BRAND Transferpette, mit Pipetiervolumen von 10-100µl; Pasteur Pipette (PP) Non Steril Graduiert 3ml
- Stoppuhr/Countdown, Nokia 6230i, CE zertifiziert, geprüft
- Monovetten der Firma Sarstedt 2,7ml, Zusatz: 1,6ml EDTA/ml Blut,
- Monovetten der Firma Sarstedt 10ml, Zusatz: Tri-Natriumcitrat-Lösung 0,106 mol/l
- Monovetten der Firma Sarstedt 10ml, ohne Zusatz
- Röhren der Firma Sarstedt (Reagenzröhrchen [RR]); 13ml
- Compoflexbeutel der Firma Fresenius Hemocare mit einem Füllvolumen von 150ml
- Vollblutentnahmesystem der Firma Macopharma für 450ml mit jeweils 63ml CPD (Vollblutfilter-Set DQT6281LW)

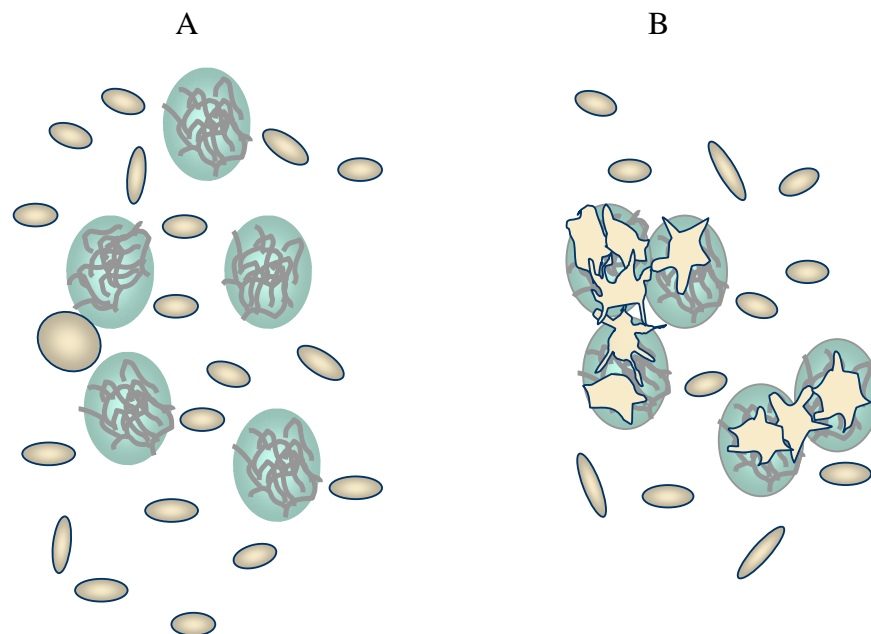
#### 4.1.2 Reagenzien

- TAK; Institut für Transfusionsmedizin Jena
- Testerythrozyten der Blutgruppe 0 (Hämatokrit von 0,5±0,02 und 0,3±0,02); Institut für Transfusionsmedizin Jena
- Testkit des Platelet ADhesion Assay für Vollblut und für TAK; HaemoSys GmbH Jena
- isotonische Kochsalzlösung 0,9% , Fresenius Spüllösung 10l

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Allgemeines Testprinzip des „Platelet Adhesion Assay“ (PADA) (HaemoSys GmbH Jena)

Endothelverletzungen beispielsweise führen durch sofortige Aktivierung zur stabil vernetzten Aggregation von PLT. Dabei übernehmen besonders bei niedrigen Scherraten die GP IIb-IIIa-Rezeptoren hinsichtlich der Vermittlung der Adhäsion an oberflächenfixiertes Fibrinogen eine wesentliche Rolle. Der PADA als Thrombozytenfunktionstest reflektiert mit der Bestimmung des Adhäsionsindex (AI) die aktuelle Adhäsivität der Blutplättchen im Organismus oder die eines TK. Daher ist der PADA zur Diagnose von pathophysiologischen Veränderungen und zur Überwachung der Therapie mit GP IIb-IIIa- und ADP-Antagonisten geeignet. In Zukunft könnte er in der Transfusionsmedizin als Qualitätskriterium für die funktionellen Eigenschaften der TAK-PLT *vor* und *nach* TF zum Einsatz kommen. Der zu untersuchenden antikoagulierten Vollblutprobe wird eine definierte Anzahl speziell designter Polymerpartikel zugesetzt. An diese lagert sich sofort blutprobeneigenes Fibrinogen an, und während einer kurzen Schüttelinkubation mit definiertem Scherstress adhären die PLT entsprechend ihres aktuellen Reaktivitätszustandes an die fibrinogenbesetzten Partikel (Abb. 6) und sind damit in einer anschließenden Zellzählung der PLT nicht mehr erfassbar.



© A. Schumann, HaemoSys GmbH

A Zugabe speziell designter Polymerpartikel zur Blutprobe. Blutprobeneigenes Fibrinogen bindet spezifisch an die Partikel. B Ein definierter Scherstress löst bei den Blutplättchen eine, ihrem aktuellen Reaktivitätszustand entsprechende, Adhäsion an diese Partikel aus.

**Abbildung 6** Testprinzip des „Platelet Adhesion Assay“

Niedrige Plättchenzahlen entsprechen einer hohen Anzahl funktionsfähiger Thrombozyten und umgekehrt. Eine Kontrollprobe ohne Partikelzusatz dient als Referenzwert.

Der AI-Normalwert beträgt bei Gesunden  $50 \pm 11$  (MW  $\pm 2$  SD) und wird wie folgt berechnet:

$$\text{Adhäsionsindex (AI)} = \frac{\text{Plättchenzahl} * \text{Kontrollprobe} - \text{Plättchenzahl} * \text{Messprobe}}{\text{Plättchenzahl} * \text{Kontrollprobe}} \times 100$$

\*[Mittelwert bei Doppelbestimmung]

Genauer betrachtet kann das an die Partikel gebundene und nun immobilisierte Fibrinogen von nicht-aktivierten GP IIb-IIIa-Rezeptoren ruhender PLT bei niedrigen Scherraten (Schüttelinkubation) gebunden werden. Dieses Reaktionsprinzip stellt eine Adhäsionsreaktion dar. Gleichfalls binden nicht aktivierte PLT an die bereits partikelgebundenen Thrombozyten, was einer Aggregationsreaktion entspricht. Gebundene PLT werden aktiviert und stimulieren ihrerseits weitere ruhende Thrombozyten, sodass ein Aktivierungskreislauf entsteht. Fazit: Der PADA nutzt den nichtaktivierten und niedrigaffinen Funktionszustand des GP IIb-IIIa, welcher nur immobilisiertes Fibrinogen binden kann. In vivo entspricht dies kollagengebundenem Fibrinogen. Im PADA-Reagenz (ex vivo) wird immobilisiertes Fibrinogen mit Hilfe speziell designte Polymerpartikel realisiert, die ihrerseits blutprobeneigenes Fibrinogen binden. Der Kern dieser Untersuchung war der Vergleich des AI von PLT im TAK unterschiedlicher Lagerungszeiten.

Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzungen von Blut und TAK wurden für die Messung des AI der PLT zwei unterschiedlich vorgegebene Partikelchargen der Firma HaemoSys verwendet; jeweils für PLT *vor* TF und *nach* TF.

#### 4.2.2 PLT-Membranglykoprotein und Aktivierungsmarker CD62P

Die Ermittlung des Thrombozyten Membranproteins P-Selektins CD62P (siehe Kapitel 2.7.3.1 ) wurde von dem Laboratorium der Klinischen Chemie der FSU Jena durchgeführt. Die für das Labor zu untersuchenden TAK- und Patienten- bzw. Kontrollblut-Proben sind jeweils mittels der von der Klinischen Chemie der FSU Jena geforderten Systeme entnommen worden.



### 4.3 Methodenvalidierung des PADA für die Untersuchungen der TAK-PLT *nach* TF

Um den PADA als Methode zur Überprüfung der Qualität in Form von gemessener Adhäsivität der TAK-PLT verwenden zu können, wurden hierfür 40 Kontrollmessungen an dafür ausgewählten Probanden (Kontrollgruppe) durchgeführt. Die Probanden der Kontrollgruppe durften keine Thrombozytopathie oder anderweitige Gerinnungsstörung aufweisen und mussten subjektiv gesund sein (keine klinischen Infektzeichen, unauffällige Laborkontrolle, unauffällige Anamnese).

Für die Methodenvalidierung wurde den Probanden der Kontrollgruppe jeweils Citratblut (2 x 10ml) entnommen. Davon wurden 2ml in ein Reagenzröhrchen (RR) mittels Pasteur Pipette (PP) pipettiert und während einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Ermittlung der PLT-Adhäsivität dieser unbehandelten Kontrollproben wie unten beschrieben. Die restlichen 18ml wurden vorsichtig in zwei RR gefüllt und bei 240 x g 12 Minuten lang in einer Eppendorf Centrifuge 5810® zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, welcher plättchenreichem Plasma (PRP) entsprach, vollständig mit dem hauptsächlich aus Erythrozyten bestehenden Zellrest der beiden RR mit einer PP vorsichtig wieder komplett vermischt und erneut 5 Minuten lang bei 2465 x g in einer Eppendorf Centrifuge 5810® zentrifugiert. Danach wurde wiederum jeweils der Serumüberstand mit dem abgesetzten Zellrest behutsam mittels PP vollständig vermischt. Die Ermittlung der PLT-Adhäsivität dieser bearbeiteten Kontrollproben, an denen die einzelnen Präparationsschritte simuliert wurden, erfolgte nach ca. 60 Minuten Ruhezeit mit dem PADA-Test im Doppelansatz.

Nach sorgsamer Homogenisierung wurde sowohl den unbehandelten als auch den 2malig zentrifugierten Kontrollproben sofort je 200µl Blut entnommen und jeweils in ein vom Hersteller dafür vorgesehenes rotes bzw. in ein farbloses Probenröhrchen pipettiert. Anschließend wurden den roten Probenröhrchen 10µl Partikelsuspension und den weißen 10µl Kontrolllösung 0.9% NaCl zugegeben. Die Homogenisierung der Partikelsuspension geschah unmittelbar vor Zugabe mittels Vortexer. Nach exakt 5 Minuten Schüttelinkubation mit dem methodenspezifisch geeichten Minishaker erfolgte sofort die Bestimmung der PLT-Anzahl in den Probenröhrchen mittels Abbott Cell-Dyn Ruby. Ein stärkeres Schwenken oder Schütteln der Proben nach der Schüttelinkubation musste vermieden werden. Der AI wurde mit Hilfe der oben benannten Formel als Mittelwert berechnet. Zwischen den unbehandelten und bearbeiteten Kontrollproben durften keine signifikanten Unterschiede auftreten. Ihre Werte mussten außerdem miteinander korrelieren. Bei 20 Kontrollblutproben wurde zusätzlich der Aktivierungsmarker P-Selektin (CD62P) für die Ermittlung und Bestimmung der Grundaktivität und maximalen Aktivierbarkeit von Thrombozyten unmittelbar nach

Abnahme bestimmt. Hierfür wurden ca. 100µl entnommen und seitens der Klinischen Chemie der Universität Jena untersucht.

## 4.4 Daten- und Probengewinnung der TAK-PLT *vor* und *nach* TF

### 4.4.1 Allgemeines

Die Untersuchungen der insgesamt 93 transfundierten TAK, welche alle im Zeitraum Januar 2007 bis August 2007 erfolgten, wurden unmittelbar *vor* und *nach* Transfusion (TF) durchgeführt. Die Ausgabe der TAK erfolgte bzgl. den Blutgruppen-Kompatibilitätsvorschriften systematisch und in Bezug auf die unterschiedlichen TAK-Alterungstage zufällig an die jeweiligen Patienten durch die Blutbank des Instituts für Transfusionsmedizin (siehe Tab. 16). Sie konnte erst nach Freigabe der kontrollierten TAK (in der Regel innerhalb 24h nach Abnahme) und innerhalb der dem Abnahmezeitpunkt folgenden 5 Tage (5 x 24h nach Entnahme) stattfinden. Dies entsprach den Tagen ,2' bis ,6'. Der Tag ,1' beinhaltete die Abnahme, Herstellung und Qualitätskontrolle. Am Ende des 6. Tages mussten die nicht transfundierten TAK verworfen werden. Dies entsprach der Festlegung der Haltbarkeitsfrist von TK vor in Krafttreten des Votums 38 vom 09. Juni 2008 des Arbeitskreises Blut des Robert-Koch-Institutes, in welchem die Verwendbarkeit für TK auf 4 Tage (4 x 24h nach Entnahme), gerechnet ab dem Entnahmetag, begrenzt wurde. Aufgrund dieses Votums wurden die Daten in den Abbildungen des Ergebnisteiles nur bis Tag 5 berücksichtigt und in der Diskussion ebenfalls bevorzugt behandelt. In der tabellarischen Darstellung sind allerdings alle Daten aufgeführt.

**Tabelle 16** TAK-Alter und Anzahl (n) der jeweiligen Untersuchungen.

Blutgruppe der TAK	Alter TAK (d)	2	3	4	5	6*	Alle
	Anzahl (n)	15	25	25	19	9	93
<b>A</b>		5	14	11	8	5	43
<b>B</b>		0	3	3	1	0	7
<b>AB</b>		3	2	4	4	0	13
<b>0</b>		7	6	7	6	4	30

\*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

## **4.4.2 TAK-PLT *vor* TF**

### **4.4.2.1 Herstellung der TAK**

Die Herstellung der TAK erfolgte ausschließlich durch Zellseparation mit der CaridianBCT®, damals Trima™ accel® Gambro BCT. Alle für diese Untersuchung verwendeten Präparate wurden entsprechend der standardisierten Herstellungsprotokolle des Instituts für Transfusionsmedizin der FSU Jena hergestellt. Spenderbedingte und technische Komplikationen traten bei keinem der für die Untersuchung verwendeten TAK auf.

### **4.4.2.2 TAK-Daten *vor* TF**

Unmittelbar *vor* TF erfolgte die Bestimmung der aktuellen Adhäsivität der PLT mittels PADA-Test und 76mal der Plättchenaktivierungsmarker CD62P. Weiterhin wurden folgende Daten, unabhängig der Messungen, mit aufgenommen:

- TAK-Nummer
- TAK-Alter
- TAK-Volumen
- TAK-PLT-Konzentration ( $\times 10^9/l$ ) und -Gehalt ( $\times 10^{11}/\text{Einheit}$ ) vom Herstellungs- und TF-Tag
- MPV vom TF-Tag

### **4.4.2.3 Probenentnahme der TAK-PLT *vor* TF**

Die Entnahme der Thrombozytenproben von etwa 5ml aus den TAK *vor* TF am Untersuchungs- bzw. Ausgabetag an die Patienten erfolgte durch Einfüllung in einen steril angeschweißten Compoflexbeutel mittels Terumo Sterile Tubing Welder® unmittelbar vor Ausgabe an die entsprechenden Patienten. Die Proben wurden anschließend sofort in Serummonovetten ohne Zusatz gefüllt und gemessen (siehe Kapitel 4.5.1). Die für das Labor zu untersuchenden Proben zur Ermittlung des PLT-Membranglykoproteins CD62P sind jeweils mittels der von der Klinischen Chemie der FSU Jena geforderten Systeme entnommen worden.

### 4.4.3 TAK-PLT *nach* TF (Patientenrekrutierung und Probengewinnung)

Ein Votum der Ethikkommission der FSU Jena an der Medizinischen Fakultät liegt mit der Bearbeitungsnummer 1785-05/06 vor.

#### 4.4.3.1 Grundlagen der Datenerhebung

Um die Qualität von TAK und ihre klinische Relevanz untersuchen und vergleichen zu können, war es notwendig ein Patientenkollektiv mit möglichst identischen Bedingungen (Erkrankung, Therapie) zu rekrutieren. Weiterhin durften diese Patienten möglichst keine bzw. nur eine unbedeutend geringe Anzahl eigener Thrombozyten bilden, damit die ermittelte Qualität, in Form von gemessener Adhäsivität (AI), der der Thrombozyten der transfundierten Konzentrate entsprach.

Diese oben genannten Bedingungen erfüllten die Patienten der Station für Stammzelltransplantation der Klinik für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Ihnen war eine Erkrankung aus dem hämatologischen Formenkreis, eine myeloablative Chemotherapie mit konsekutiver autologer bzw. allogener PBSZT sowie vergleichbare Behandlung, Überwachung und Betreuung gemeinsam (siehe Tab. 17).

**Tabelle 17** Darstellung der Patientendaten (Diagnose, Therapie, Chemotherapie ATG und Anzahl der Messungen; jeweils unterteilt nach Geschlecht).

		Patienten		
		Insgesamt	Frauen	Männer
<b>Patienten</b>	Insgesamt	24	11	13
	ohne ATG Chemotherapie	16	6	10
	mit ATG Chemotherapie	8	5	3
<b>Diagnose</b>	AML/ALL	12	7	5
	CML	1	0	1
	andere, wie: NHL, Plasmozytom, Keimzelltumor	11	7	4
<b>Therapie</b>	Fremd-Allogene PBSZT	11	6	5
	Familien-Allogene PBSZT	4	3	1
	autologe PBSZT	9	2	7
<b>Messungen</b>	Insgesamt	93	29	64
	ohne ATG Chemotherapie	48	16	32
	mit ATG Chemotherapie	45	13	32

Somit konnte praktisch jede TF, inklusive Messung und Datenerhebung, als voneinander unabhängig bewertet werden, da die Patienten für die Untersuchung der Daten keine unmittelbare Rolle spielten, bzw. deren individuelle Einflüsse vernachlässigbar waren.

Die Indikationsstellung für die Thrombozytentransfusion wurde seitens der behandelnden Ärzte anhand des klinischen Bildes und der Laborwerte des morgendlichen Routine-EDTA-Blutbildes, insbesondere der Thrombozytenzahl unter Berücksichtigung der damals gültigen Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008, den Richtlinien der Bundesärztekammer 2006 sowie deren Änderungen und Ergänzungen 2008 gestellt.

Die Patienten wurden bei Ihrer Krankenhausaufnahme nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung und bei Vorliegen Ihrer schriftlichen Einverständniserklärung in die Studie eingeschlossen.

#### **4.4.3.2 Messdaten *nach* TF (PLT- und Patientendaten)**

Im Zeitraum Januar 2007 bis August 2007 sind insgesamt 93 Patientenmessungen mittels PADA-Test, davon 88 nach Einzel-TAK-TF und 5 nach Doppel-TAK-TF, an 24 verschiedenen Patienten der Station für Periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT) und Knochenmarktransplantation (KMT) der FSU Jena durchgeführt worden (siehe Tab. 17).

Nach jeder TAK-TF am Patienten erfolgte die Bestimmung der aktuellen Adhäsivität (AI) der Blutplättchen mittels PADA sowie die Ermittlung des korrigierten Inkrements (CCI) und der Recovery als Indikatoren für den Thrombozytenanstieg. Zusätzlich wurde 26mal der Plättchenaktivierungsmarker CD62P durch die Klinische Chemie bestimmt. Außerdem wurden folgende Patientendaten aufgenommen: Geschlecht, Alter, Gewicht, Größe, Blutgruppe, Antikörper (HLA, Blutgruppen-AK), Hämatologie (PLT, HK, RBC, Leukozyten), Entzündungsparameter (CRP, Fibrinogen), Liegedauer und TAK-Gesamtbedarf (siehe Tab. 18).

**Tabelle 18** Darstellung der Mittelwerte (MW), Standardfehler des MW (SFMW) sowie Minimum und Maximum ausgewählter Parameter.

<b>Alter TAK (d)</b>		<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6*</b>	<b>Alle</b>
<b>Anzahl (n)</b>		15	25	25	19	9	93
<b>Alter</b>	MW	48,6	34,2	41,2	41,6	44,1	40,9
	SFMW	2,9	2,9	3,5	3,5	5,7	1,6
	Min	21,0	21,0	21,0	21,0	23,0	21,0
	Max	61,0	57,0	68,0	68,0	65,0	68,0
<b>Gewicht [kg]</b>	MW	73,7	69,6	69,0	71,5	75,0	71,0
	SFMW	3,9	3,1	2,9	3,8	4,5	1,6
	Min	55,0	54,9	54,9	54,9	54,9	54,9
	Max	106,0	98,0	98,0	106,0	97,0	106,0
<b>Größe [cm]</b>	MW	168,5	175,4	174,8	173,8	176,1	173,9
	SFMW	1,9	2,0	1,8	2,3	3,9	1,0
	Min	160,0	163,0	163,0	160,0	162,0	160,0
	Max	186,0	190,0	190,0	190,0	190,0	190,0
<b>Liegedauer in d</b>	MW	51,6	69,7	62,8	54,7	58,6	60,8
	SFMW	4,3	3,7	4,7	5,6	9,5	2,3
	Min	17,0	41,0	8,0	8,0	22,0	8,0
	Max	66,0	103,0	103,0	103,0	103,0	103,0
<b>TAK-Gesamtbedarf</b>	MW	16,5	31,6	29,4	21,6	17,6	25,1
	SFMW	3,9	3,7	3,8	4,3	6,6	2,0
	Min	1,0	5,0	2,0	2,0	3,0	1,0
	Max	47,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

MW Mittelwert; SFMW Standardfehler des Mittelwertes; TF-Tag Transfusionstag; Prod. Tag Produktionstag;  
 \*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

#### 4.4.3.3 Probenentnahme der TAK-PLT *nach* TF

Die Blutentnahme am Patienten erfolgte 1-2 Stunden *nach* TAK-TF durch das Pflegepersonal der KMT FSU Jena in der Regel aus einem zentralen Venenkatheter, selten mittels Port-Katheter-System: Für die Bestimmung des PADA und den Plättchenmembranrezeptor CD62P durch die Klinische Chemie wurde jeweils Blut in ein Citrat-Abnahmesystem (Sarstedt-Monovette, 2 x 10ml) entnommen und für die Bestimmung des Blutbildes stets EDTA-antikoaguliertes Blut (Sarstedt-Monovette, 1 x 2,75ml) verwendet.

## 4.5 Testdurchführung mittels PADA

### 4.5.1 Untersuchung der TAK-PLT *vor* TF mittels PADA

Die Untersuchung der PLT der 114 TAK unterschiedlichen Alters erfolgte immer am Tage der TF. Hierfür wurden den TAK unmittelbar vor Ausgabe an die vorher rekrutierten Patienten ca. 5ml Konzentrat entnommen und sofort die Adhäsivität mittels PADA gemessen (siehe Kapitel 4.4.2.3). Bei jeder Probe ist die Thrombozytenzahl sowie das mittlere Plättchenvolumen (MPV) mit dem Abbott Cell-Dyn Ruby aus der Probe bestimmt worden.

Die Durchführung des PADA mit den TAK erfolgte mit Testerythrozyten (RBC) der Blutgruppe 0 jeweils im Doppelansatz mit einem HK von  $0,50 \pm 0,02$  bzw.  $0,30 \pm 0,02$ , um einen annähernd physiologischen HK von 0,39 bzw. den HK der Patienten von ca.  $0,23 \pm 0,02$  imitieren zu können. Für die Durchführung wurden 200µl RBC mit jeweils 50µl TAK in die beiden vom Hersteller vorgesehenen Probenröhrchen (rot und weiß) pipettiert. Anschließend wurde nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur 10µl Partikelsuspension in das rote Probenröhrchen bzw. 10µl Kontrolllösung 0.9% NaCl aus dem Testkit in das weiße Probenröhrchen gegeben. Nach 5 Minuten Schüttelinkubation wurde weiteres Schütteln oder Schwenken der Proben vermieden und die Plättchenzahl sofort mit dem Abbott Cell-Dyn Ruby bestimmt. Die Berechnung der AI erfolgte mit Hilfe der in 4.2.1 benannten Formel. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert für den HK 0.39 bzw. 0,23 aus den Doppelansatzmessungen ermittelt.

### 4.5.2 Untersuchung der TAK-PLT *nach* TF mittels PADA

Das 1-2 Stunden *nach* TAK-TF entnommene Patienten-Citratblut (2 x 10ml) wurde vorsichtig in zwei Reagenzröhrchen (RR) gefüllt und bei 240 x g für 12 Minuten in einer Eppendorf Centrifuge 5810® zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, welcher Plättchenreichem Plasma (PRP) entsprach, vollständig mit einer Pasteur Pipette (PP) abgezogen und jeweils in ein neues RR pipettiert. Der nach der 1. Zentrifugation hauptsächlich aus Erythrozyten bestehende Zellrest der beiden RR wurde jeweils mit einer PP vorsichtig gemischt. Diesen RR sind stets 150µl mit einer Eppendorf Pipette® entnommen und jeweils den RR mit PRP zugegeben worden, sodass dieser Schritt einen Hämatokritwert (HK) von ca. 0,14 ( $\pm 0,02$ ) ergab. Die beiden RR mit den PRP wurden nach behutsamen Schwenken 5 Minuten lang in einem 2. Zentrifugationsschritt bei 2465 x g in einer Eppendorf Centrifuge 5810® zentrifugiert. Danach wurde jeweils der Serumüberstand

in den zwei RR mit einer PP bis auf etwa eine 1:1 Höhe Zellrest zu Serum abgezogen. Dieser gewonnene Zellrest wurde jeweils mit Hilfe einer Eppendorf Pipette® (200µl) mit dem darüber stehen gelassenen Serum achtsam durchmischt und zusammengeführt. Die Ermittlung der PLT-Adhäsivität dieser hergestellten plättchenreichen Patientenprobe erfolgte nach ca. 60 Minuten Ruhezeit mit dem PADA-Test im Doppelansatz: Nach vorsichtiger Homogenisierung wurde der plättchenreichen Patientenprobe sofort 4mal 200µl Blut (HK  $0,23 \pm 0,02$ ) entnommen und jeweils in zwei rote bzw. zwei farblose, vom Hersteller dafür vorgesehene Probenröhrchen, pipettiert. Anschließend wurde den roten Proberöhrchen 10µl Partikelsuspension und den weißen Proberöhrchen 10µl Kontrolllösung 0.9% NaCl zugegeben. Die Partikelsuspension wurde unmittelbar vor Zugabe mittels Vortexer homogenisiert. Nach exakt 5 Minuten Schüttelinkubation mit dem methodenspezifisch geeichten Minishaker erfolgte sofort die PLT-Anzahl Bestimmung der beiden Probenröhrchen mittels Abbott Cell-Dyn Ruby. Nach der Schüttelinkubation wurde stärkeres Schwenken oder Schütteln der Proben vermieden. Der AI wurde mit Hilfe der in Kapitel 4.2.1 benannten Formel berechnet. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert aus den Doppelansatzmessungen bestimmt. Der AI-Normalwert ( $MW \pm 2 \text{ SD}$ ) wird vom Hersteller mit  $50 \pm 11$  angegeben.

## 4.6 Statistik

Die statistische Auswertung der gruppenabhängigen Unterschiede und bezüglich der Lagerungszeit erfolgten mit der Multiplen Varianzanalyse, dem gepaarten T-Test und der Korrelationsanalyse des Programms SPSS Version 15.0 und mit Rücksprache des Instituts für Medizinische Statistik. Als *signifikant* sind p-Werte  $<0,05$  betrachtet worden. P-Werte  $<0,01$  sind als *sehr signifikant* und  $p < 0,001$  als *hochsignifikant* angenommen worden.



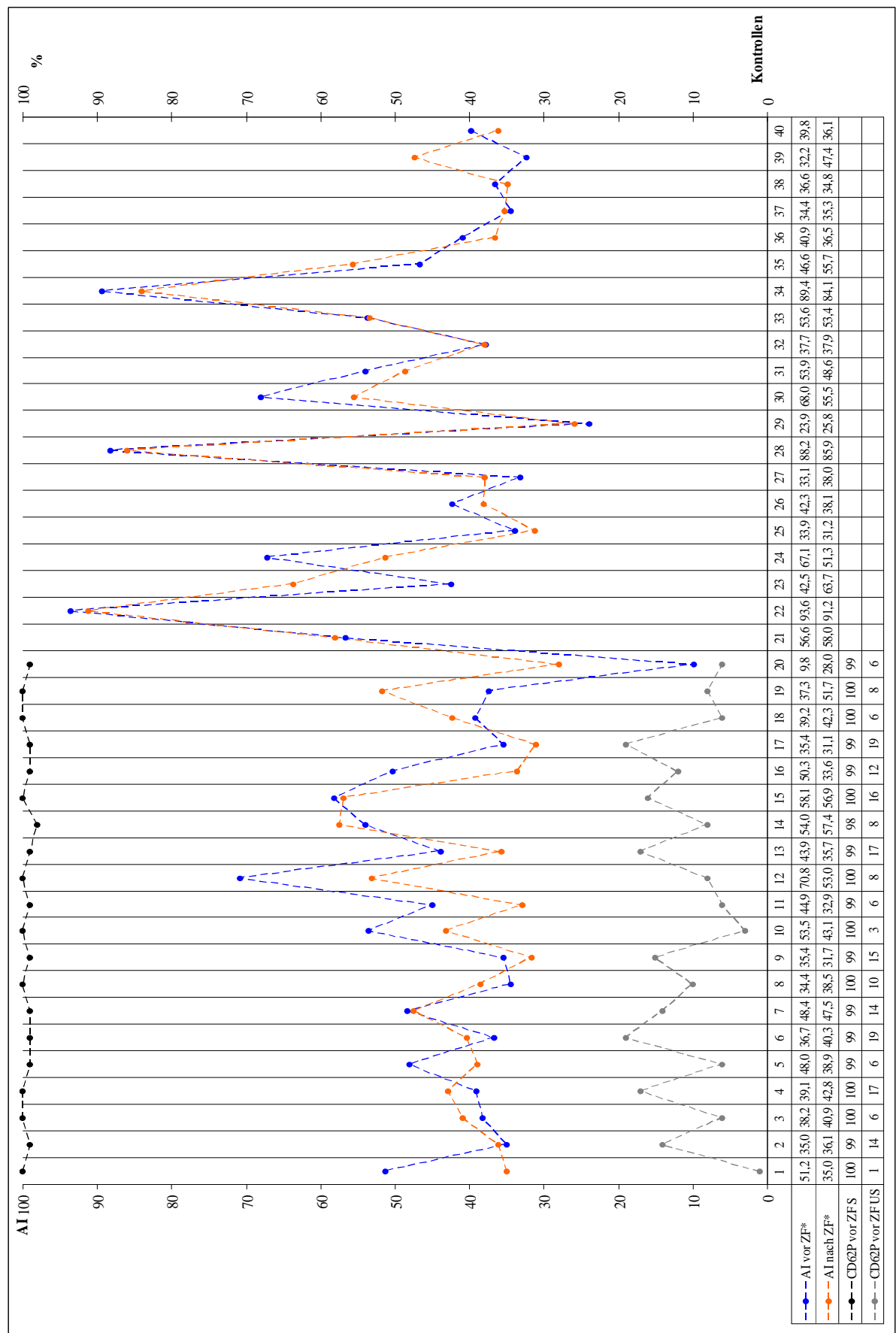
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Allgemeines

Die aus den ermittelten Daten berechneten Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SFMW) wurden tabellarisch und teilweise grafisch dargestellt bzw. im fortlaufenden Text erörtert. Auf Besonderheiten, wie Signifikanzunterschiede und Korrelationen, wurde speziell eingegangen, jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in den Grafiken. In den Legenden der Grafiken wurde auf die entsprechende Tabelle verwiesen. Der Vergleich der Daten erfolgte sowohl zwischen den Alterungstagen der TAK-PLT (*vor* bzw. *nach* TF), innerhalb der jeweiligen TAK-Alterungstage als auch im gesamten Mittel über alle Alterungstage in Abhängigkeit der jeweiligen Parameter.

### 5.2 Darstellung der Validierung des PADA für die Untersuchungen *nach* TF

Bei der Überprüfung eines möglichen Einflusses der Präparationsschritte, wie Zentrifugation und Pipettiervorgänge, während der Durchführung des PADA zur Bestimmung des AI, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den bearbeiteten Kontrollproben gefunden werden ( $p=0,368$ ). Die Wertepaare korrelierten sehr hoch miteinander ( $r=0,852$ ), wie auch in Abbildung 7 erkennbar ist.



**Abbildung 7** Verwendung des Pada und der CD62P-Untersuchung; Grafische Darstellung des AI und des CD62P (in %) der Kontrollprobanden *vor* und *nach* den Zentrifugationsschritten analog zur Aufbereitung der Patientenproben *nach* TAK-TF; \*ZF Zentrifugation, AI *vor* ZF zu AI *nach* ZF  $p=0,368$  und  $r=0,852$ ; S Stimuliert; US Unstimuliert. Charakteristik und Qualitätsparameter der (transfunden) TAK

### 5.3 Charakteristik und Qualitätsparameter der (transfundenen) TAK

Alle TAK unterlagen den im Routinebetrieb des Institutes für Transfusionsmedizin durchgeführten Qualitätskontrollen (Resterythrozyten- und Restleukozytengehalt). Dabei wurden keine Mängel festgestellt. Die durchschnittliche Konzentration der insgesamt 93 transfundenen TAK unterschiedlichen Alters (siehe Tab. 19) betrug am Produktionstag (Prod. Tag)  $1090,1 \times 10^9/l$  PLT (MW), suspendiert in etwa 255,3ml (MW) autologem Spenderplasma. Dies entspricht einem mittleren Thrombozytengehalt von  $2,78 \times 10^{11}/\text{Einheit}$  (MW). Am Transfusionstag wurde eine Konzentration von  $1025,8 \times 10^9/l$  PLT (MW), suspendiert in etwa 255,3ml (MW), erreicht, was einem Gehalt von  $2,62 \times 10^{11}/\text{Einheit}$  gleich kommt. Das MPV der TAK und das TAK-Volumen sowie die Konzentrationen und die PLT-Gehälter der einzelnen TAK-Alterungstage wiesen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen TAK-Alterungstage zueinander auf (siehe Tab. 19).

**Tabelle 19** Qualitätsparameter der transfundenen TAK, (p) Signifikanz der Gruppenvergleiche.

Alter TAK (d)		2	3	4	5	6*	Alle	Signifikanz
Anzahl (n)		15	25	25	19	9	93	
TAK-Volumen (in ml, Prod.Tag)	MW	257,0	254,3	257,2	254,0	251,3	255,2	nein
	SFMW	2,1	2,4	2,9	2,3	4,6	1,2	
	Min	243,0	229,0	230,0	235,0	223,0	223,0	
	Max	268,0	270,0	282,0	271,0	268,5	282,0	
PLT/ $\times 10^9$ (Prod.Tag)	MW	1119,2	1082,2	1107,2	1054,3	1093,5	1090,1	nein
	SFMW	25,9	27,2	23,1	26,5	30,4	12,1	
	Min	965,0	819,0	915,0	907,0	956,0	819,0	
	Max	1299,0	1369,0	1372,0	1266,0	1203,0	1372,0	
PLT-Gehalt/ TAK (Prod.Tag)	MW	2,9E+11	2,7E+11	2,8E+11	2,7E+11	2,7E+11	2,8E+11	nein
	SFMW	8,0E+09	7,0E+09	6,5E+09	6,4E+09	1,2E+10	3,4E+09	
	Min	2,4E+11	2,1E+11	2,4E+11	2,2E+11	2,1E+11	2,1E+11	
	Max	3,5E+11	3,6E+11	3,6E+11	3,2E+11	3,1E+11	3,6E+11	
PLT/ $\times 10^9$ (TF-Tag)	MW	1053,0	993,4	1043,4	1030,9	1011,0	1025,8	nein
	SFMW	33,3	26,8	31,6	36,6	35,0	14,7	
	Min	846,3	752,0	653,3	718,0	856,0	653,3	
	Max	1253,0	1259,7	1350,7	1304,0	1196,3	1350,7	
PLT-Gehalt/ TAK (TF-Tag)	MW	2,7E+11	2,5E+11	2,7E+11	2,6E+11	2,5E+11	2,6E+11	nein
	SFMW	9,3E+09	7,1E+09	8,1E+09	9,2E+09	1,1E+10	3,9E+09	
	Min	2,2E+11	1,9E+11	1,6E+11	1,8E+11	2,1E+11	1,6E+11	
	Max	3,4E+11	3,3E+11	3,4E+11	3,3E+11	3,2E+11	3,4E+11	
TAK-MPV (in fl, TF-Tag)	MW	6,1	6,5	6,4	6,4	6,1	6,3	nein
	SFMW	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	
	Min	5,0	4,9	4,8	5,0	5,0	4,8	
	Max	7,6	8,0	8,6	7,9	7,5	8,6	
Visuelle Kontrolle		Beutel unversehrt, "Swirling" vorhanden						nein

MW Mittelwert; SFMW Standardfehler des Mittelwertes; TF-Tag Transfusionstag; Prod. Tag Produktionstag;

\*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

Allerdings ist der Unterschied der Thrombozytenkonzentrationen ( $\text{PLT}/\text{l} \times 10^9$ ) der Prod. Tage (MW 1090,1) gegenüber den TF-Tagen (MW 1025,8) im gesamten Mittel über alle Alterungstage hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Beim Vergleich der Thrombozytenkonzentration ( $\text{PLT}/\text{l} \times 10^9$ ) am Prod. Tag (MW 1090,1) gegenüber dem jeweiligen TF-Tag (MW 1025,8) zeigte sich lediglich am Tag 3 ein sehr signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied (siehe Tab. 20). Analog verhielt sich die Differenz des PLT-Gehaltes/TAK: Hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) im gesamten Mittel der Prod. Tage ( $\text{MW } 2,78 \times 10^{11}$ ) zu den TF-Tagen ( $\text{MW } 2,62 \times 10^{11}$ ) und am Tag 3 sehr signifikant ( $p < 0,01$ ).

**Tabelle 20** Darstellung der Paarvergleiche: PLT-Konzentration ( $\text{PLT}/\text{l} \times 10^9$ ) und PLT-Gehalt/TAK ( $\times 10^{11}$ ) jeweils Prod. Tag zu TF-Tag; Berechnung von Gruppenpaaren am gleichen TAK-Alterungstag und des gesamten Mittels, (p) Signifikanz der Gruppenpaare zueinander.

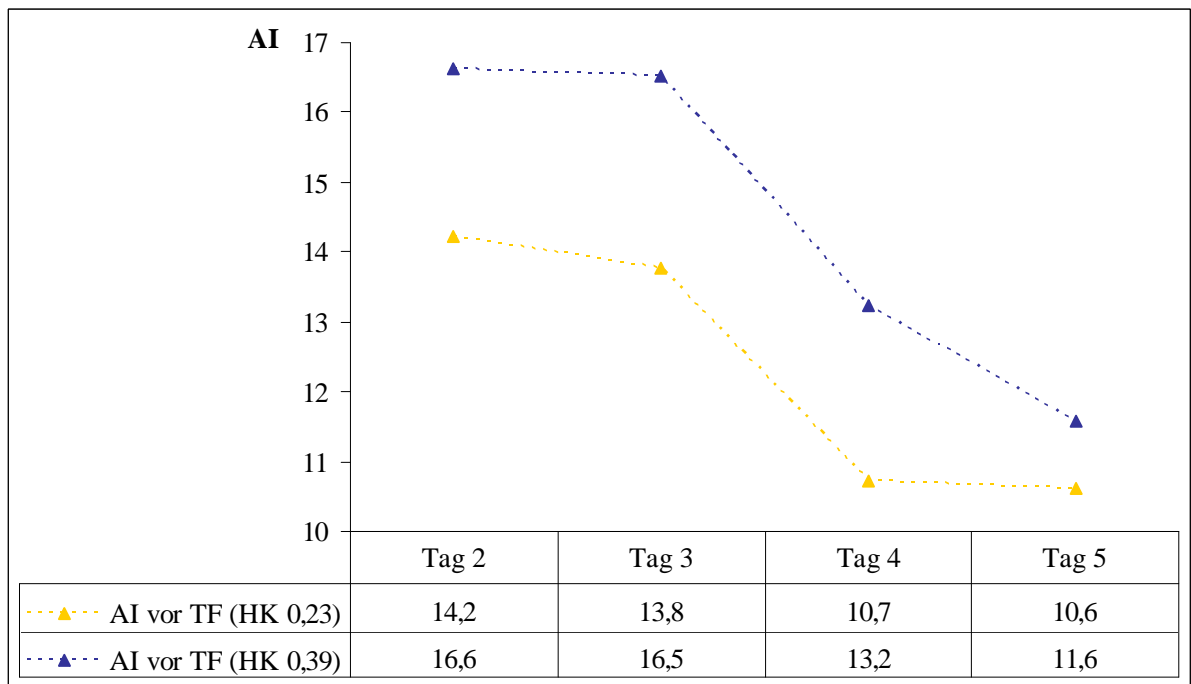
Berechnung von Gruppenpaaren	Alter TAK (d)	2	3	4	5	6*	gesamtes Mittel
	Anzahl (n)	15	25	25	19	9	93
<b>PLT/<math>\times 10^9</math> Prod. zu TF-Tag</b>	Signifikanz (p) der MW-Abweichung	0,162	0,004	0,094	0,130	0,238	<0,001
<b>PLT-Gehalt/TAK Prod. zu TF-Tag</b>	Signifikanz (p) der MW-Abweichung	0,161	0,003	0,090	0,131	0,245	<0,001

\*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

## 5.4 Adhäsionsindex (AI) und CD62P der TAK-PLT *vor* TF

### 5.4.1 Darstellung von Adhäsionsindex (AI) der TAK-PLT *vor* TF

Die Messung der aktuellen Adhäsivität der TAK-PLT *vor* und *nach* TF erfolgte mittels Bestimmung des Adhäsionsindex (AI) durch den PADA als Thrombozytenfunktionstest. Es konnte entsprechend Rummler 2005 eine Abhängigkeit des AI von dem Hämatokrit (HK) bestätigt werden (siehe Abb. 8 und Tab. 21): Die Versuchsreihe der TAK-PLT *vor* TF mit einem HK von 0,39 korrelierte mit der eines HK von 0,23 ( $r=0,651$ ). Bei Vergleich der Messpaare (HK 0,23/0,39) des jeweils gleichen TAK-Alterungstages ergaben sich in Bezug auf den HK an den Alterungstagen 2, 4 und 6 jeweils signifikante ( $p < 0,05$ ) und im gesamten Mittel über alle Alterungstage hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Differenzen.



**Abbildung 8** Verwendung des Pada, Grafische Darstellung des AI der TAK-PLT *vor* TF bzgl. der HK-Unterschiede. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 21 und 22 dargestellt.

**Tabelle 21** Darstellung des Gruppenvergleiches bzgl. der HK-Unterschiede der TAK-PLT *vor* TF jeweils an den gleichen TAK-Alterungstagen und des gesamten Mittels, (p) Signifikanz der Gruppenpaare zueinander.

Berechnung von Gruppenpaaren	Alter TAK (d)	2	3	4	5	6*	gesamtes Mittel
	Anzahl (n)	15	25	25	19	9	93
AI <i>vor</i> TF HK 0,23 zu 0,39	Signifikanz (p) der MW-Abweichung	0,045	0,085	0,044	0,368	0,023	<0,001; r=0,651

\*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

Weiterhin konnte der Abfall des AI in Abhängigkeit von der zunehmenden Lagerungszeit bestätigt werden: Bei Betrachtung der TAK-Versuchsreihe mit einem HK von 0,23 unterschieden sich die Messungen der transfundierten TAK am Tage 2 und 3 signifikant vom Tag 6 ( $p < 0,05$ ). Bei einem HK von 0,39 ergaben sich hierbei keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 22).

**Tabelle 22** Darstellung des AI der TAK-PLT *vor* TF jeweils bei selbigem HK, (p) Signifikanz der Gruppenvergleiche.

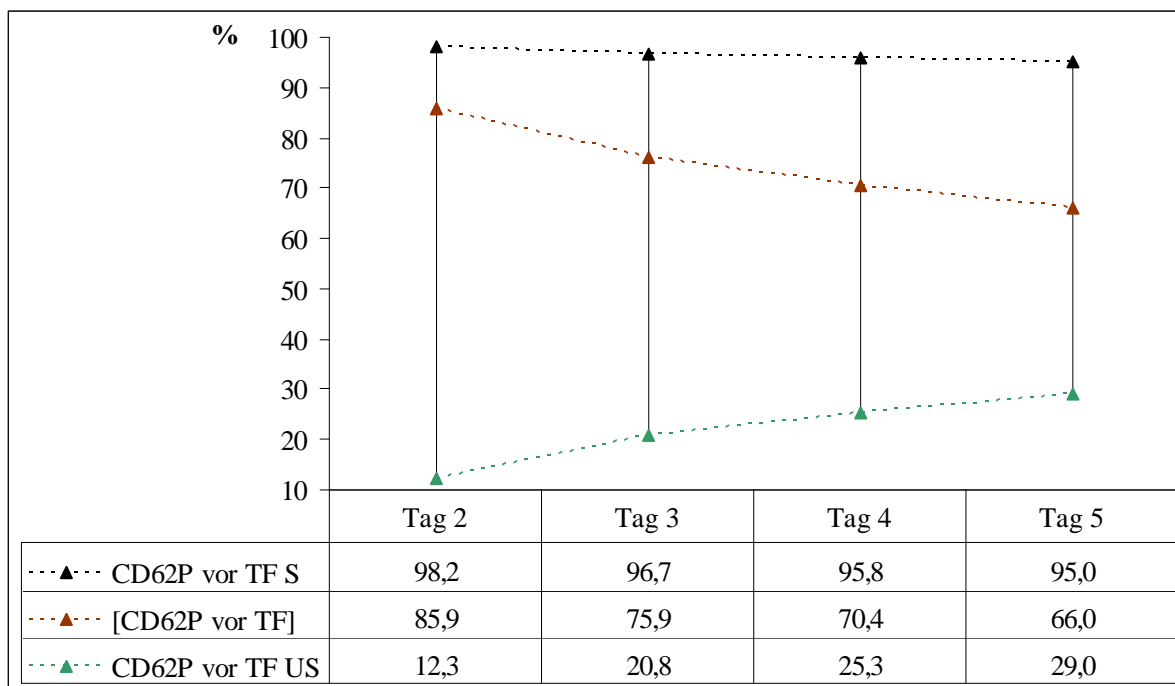
Alter TAK (d)		2	3	4	5	6*	Alle	Signifikanz
Anzahl (n)		15	25	25	19	9	93	
AI <i>vor</i> TF (HK 0,23) <sup>\$</sup>	MW	14,2	13,8	10,7	10,6	7,3	11,8	(p<0,05) Tag 2-6* (p<0,05) Tag 3-6*
	SFMW	0,9	1,1	1,1	1,3	1,0	0,6	
	Min	8,4	4,0	2,5	2,5	3,4	14,0	
	Max	19,4	26,9	24,6	20,1	11,6	78,5	
AI <i>vor</i> TF (HK 0,39) <sup>\$</sup>	MW	16,6	16,5	13,2	11,6	10,1	14,0	nein
	SFMW	1,2	1,8	1,4	1,6	1,4	0,8	
	Min	9,0	3,5	1,8	2,0	1,2	1,2	
	Max	24,1	38,1	27,6	26,0	16,5	38,1	

<sup>\$</sup>HK Hämatokrit; (HK 0,23) entspricht im MW dem HK der Pat; (HK 0,39) entspricht einem physiologischen HK von Frauen und Männern; MW Mittelwert; SFMW Standardfehler des Mittelwertes; TF-Tag Transfusionstag; Prod. Tag: Produktionstag; \*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

#### 5.4.2 Darstellung von CD62P der TAK-PLT *vor* TF

Für den PLT Membranrezeptor CD62P, als Marker für den Aktivierungszustand der PLT (Hesse et al. 2001, Rinder 1998; siehe Kapitel 2.7.3.1), wurde zur Auswertung der Ergebnisse der prozentuale Anteil CD62P-positiver Zellen in der Gesamtpopulation *vor* und *nach* Aktivierung mit TRAP-6 sowie deren Differenz herangezogen.

Der prozentuale Anteil der unstimulierten CD62P-positiven Zellen (US) *vor* TF stieg bei Vergleich der TAK-Alterungstage zueinander am Tag 2 zum Tag 6 hochsignifikant an (p<0,001). Ferner wurde an den Tagen 4 und 5 ein sehr signifikanter Anstieg gegenüber dem Tag 2 ermittelt (p<0,01) und am Tag 3 zum Tag 6 eine Signifikanz von p<0,05. Der CD62P-positive Anteil nahm im Verlauf der Lagerungszeit nach Stimulation mit TRAP-6 (S) geringfügig ab ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Alterungstagen zu zeigen. Die Differenzwerte der stimulierten und unstimulierten prozentualen Anteile CD62P-positiver PLT an den jeweiligen Alterungstagen ([CD62P *vor* TF], braune Kurve in Abb.9) erwiesen sich am Tag 2 im Vergleich zu den Tagen 5 und 6 hochsignifikant (p<0,001), an dem Tag 2 gegenüber dem Tag 4 sowie am Tag 3 zum Tag 6 mit p<0,01 sehr signifikant größer. Des Weiteren lag der prozentuale CD62P-Anteil der PLT am Tag 5 signifikant niedriger als am Tag 3 (p<0,05); siehe Abb. 9 und Tab. 23.



**Abbildung 9** Verwendung der CD62P-Untersuchung, Grafische Darstellung der CD62P-positiven TAK-PLT *vor* TF in %, US Unstimuliert, S Stimuliert, [] Differenz von S und US. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 23 und 24 dargestellt.

**Tabelle 23** Darstellung der CD62P-positiven TAK-PLT *vor* TF in %.

Alter TAK (d)		2	3	4	5	6*	Alle	Signifikanz
Anzahl (n)		9	24	22	12	9	76	
CD62P <i>vor</i> TF US, (%)	MW	12,3	20,8	25,3	29,0	34,1	24,0	(p<0,001) Tag 2-6*; (p<0,01) Tag 2-4&5; (p<0,05) Tag 3-6*
	SFMW	1,0	2,1	1,9	3,4	5,4	1,4	
	Min	5,0	5,0	12,0	15,0	11,0	5,0	
	Max	15,0	43,0	46,0	56,0	57,0	57,0	
CD62P <i>vor</i> TF S, (%)	MW	98,2	96,7	95,8	95,0	95,2	96,2	nein (p=0,056)
	SFMW	0,4	0,3	0,9	0,6	0,9	0,3	
	Min	95,0	94,0	79,0	91,0	92,0	79,0	
	Max	99,0	99,0	99,0	97,0	99,0	99,0	
[CD62P <i>vor</i> TF] (%)	MW	85,9	75,9	70,4	66,0	61,1	72,2	(p<0,001) Tag 2-5&6*; (p<0,01) Tag 2-4; (p<0,01) Tag 3-6*; (p<0,05) Tag 3-5
	SFMW	1,3	2,1	2,1	3,5	5,3	1,4	
	Min	80,0	51,0	51,0	38,0	36,0	36,0	
	Max	94,0	91,0	84,0	81,0	82,0	94,0	

US Unstimuliert; S Stimuliert; [] Differenz von Stimuliert und Unstimuliert; MW Mittelwert; SFMW Standardfehler des Mittelwertes; TF-Tag Transfusionstag; Prod. Tag Produktionstag; \*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

Wie aus der Abbildung 9 und Tabelle 24 hervorgeht, sind die Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen der stimulierten und unstimulierten CD62P-positiven PLT *vor* TF an den jeweiligen TAK-Alterungstagen und hinsichtlich des gesamten Mittels über alle Alterungstage hochsignifikant (p<0,001).

**Tabelle 24** Darstellung des Gruppenvergleiches der CD62P-positiven TAK-PLT *vor* TF in %, Betrachtung der Unterschiede von US zu S jeweils an den gleichen TAK-Alterungstagen und des gesamten Mittels, (p) Signifikanz der Gruppenpaare zueinander.

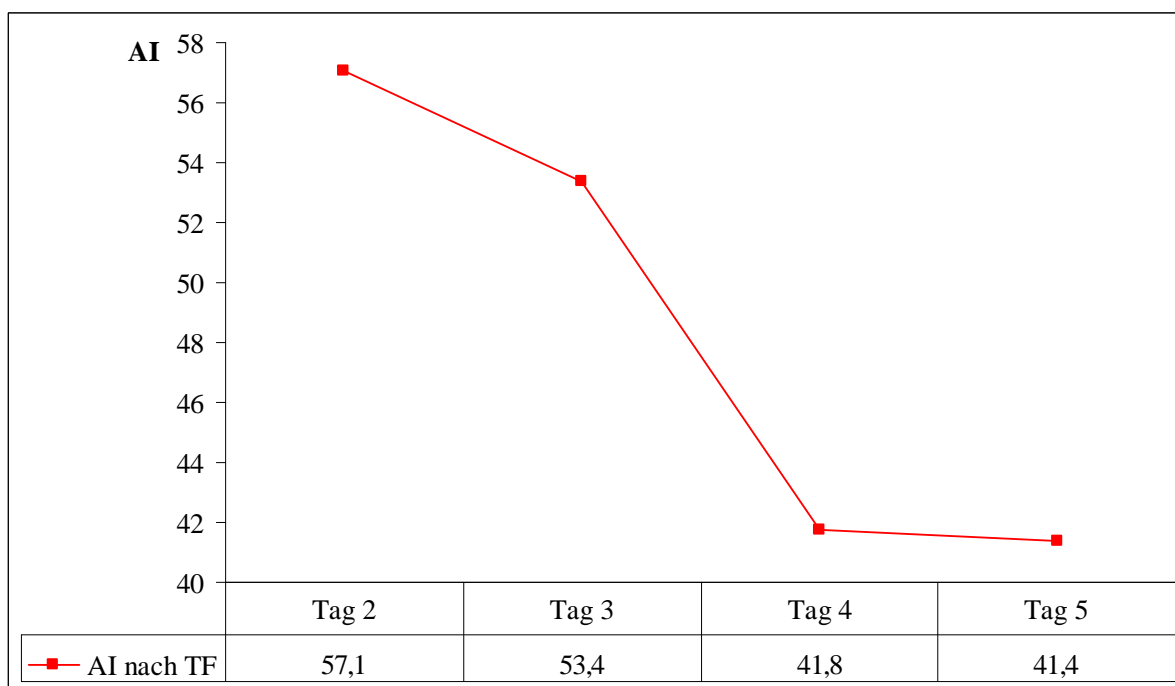
Berechnung von Gruppenpaaren	Alter TAK (d)	2	3	4	5	6*	gesamtes Mittel
	Anzahl (n)	9	24	22	12	9	76
CD62P <i>vor</i> TF US zu S <sup>\$</sup>	Signifikanz (p) der MW-Abweichung	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

<sup>\$</sup>US Unstimuliert; S Stimuliert; \*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

## 5.5 Darstellung des Adhäsionsindex (AI) , CD62P, CCI und der Recovery der TAK-PLT *nach* TF

### 5.5.1 Darstellung von Adhäsionsindex (AI) der TAK-PLT *nach* TF

Der gemessene AI der TAK-PLT *nach* TF sank mit zunehmenden Alter der transfundierten PLT von 57,1 (MW) am Tag 2 auf 32,8 am Tag 6 hochsignifikant ab ( $p < 0,001$ ); siehe Abb. 10 und Tab. 25.



**Abbildung 10** Verwendung des Pada, Grafische Darstellung des AI der TAK-PLT *nach* TF jeweils bei selbigem HK (0,23). Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 25 dargestellt.



**Tabelle 25** Darstellung des AI der TAK-PLT *nach* TF jeweils bei selbigem HK (0,23), (p) Signifikanz der Gruppenvergleiche.

Alter TAK (d)		2	3	4	5	6*	Alle	Signifikanz
Anzahl (n)		15	25	25	19	9	93	
AI <i>nach</i> TF	MW	57,1	53,4	41,8	41,4	32,8	46,4	(p<0,001) Tag 2-6* (p<0,01) Tag 2-4/5; (p<0,01) Tag 3-6*; (p<0,05) Tag 3-4/5;
	SFMW	3,4	2,5	3,3	2,4	3,0	1,6	
	Min	31,0	28,7	14,0	20,9	19,7	14,0	
	Max	78,5	74,7	68,2	58,5	49,8	78,5	

MW Mittelwert; SFMW Standardfehler des Mittelwertes; TF-Tag Transfusionstag; Prod. Tag Produktionstag;

\*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

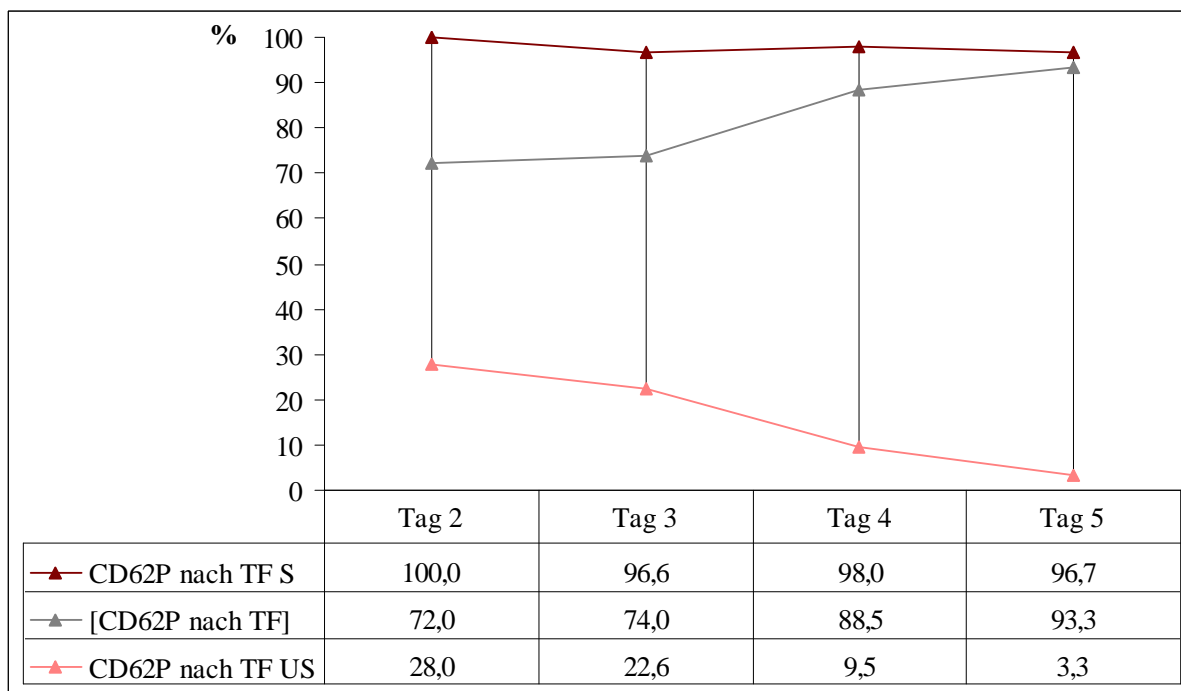
Darüber hinaus fiel der AI von Tag 2 sehr signifikant im Vergleich zu den AI der Tage 4 und 5 ab ( $p<0,01$ ); analog der AI von Tag 3 gegenüber dem Tag 6. Ebenfalls verringerte sich der AI der Tage 4 und 5 gegenüber Tag 3 signifikant ( $p<0,05$ ).

Des Weiteren ließ sich nur eine leichte Korrelation der AI der TAK-PLT *vor* TF (HK im Mittel 0,23) mit den AI der selbigen PLT *nach* TF feststellen ( $r=0,427$ ). Der AI der TAK-PLT *vor* TF mit einem HK von 0,39 korrelierte kaum mit den AI der selbigen PLT *nach* TF ( $r=0,345$ ); siehe auch Abb. 14.

### 5.5.2 Darstellung von CD62P der TAK-PLT *nach* TF

Die prozentualen Anteile der unstimulierten CD62P-positiven Zellen (US) *nach* TF verhielten sich invers gegenüber den prozentualen Anteilen der unstimulierten CD62P-positiven Zellen (US) *nach* TF (siehe Kapitel 5.5.3).

Die prozentualen Anteile der unstimulierten CD62P-positiven Zellen (US) *nach* TF lagen beim Vergleich der TAK-Alterungstage zueinander an den Tagen 2 und 3 signifikant höher als der prozentuale Anteil am Tag 5 ( $p<0,05$ ). Nach Stimulation mit TRAP-6 (S) nahm der CD62P-positive Anteil im Verlauf der Lagerungszeit analog zu den Werten *vor* TF nur geringfügig ab, ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Alterungstagen zu zeigen. Die Differenzwerte der stimulierten und unstimulierten prozentualen Anteile CD62P-positiver PLT an den jeweiligen Alterungstagen ([CD62P *nach* TF], graue Kurve in Abb.11) erwiesen sich am Tag 3 im Vergleich zu den Tagen 4 und 5 signifikant niedriger ( $p<0,05$ ); siehe Abb. 11 und Tab. 26.



**Abbildung 11** Verwendung der CD62P-Untersuchung, Grafische Darstellung der CD62P-positiven TAK-PLT *nach* TF in %, US Unstimuliert, S Stimuliert, [] Differenz von S und US. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 26 und 27 dargestellt.

**Tabelle 26** Darstellung der CD62P-positiven TAK-PLT *nach* TF in %.

Alter TAK (d)		2	3	4	5	6*	Alle	Signifikanz
Anzahl (n)		2	7	8	3	6	26	
CD62P <i>nach</i> TF US, (%)	MW	28,0	22,6	9,5	3,3	21,0	16,4	(p<0,05) Tag 2-5; (p<0,05) Tag 3-5
	SFMW	1,0	4,6	3,0	1,2	6,0	2,5	
	Min	27,0	5,0	2,0	1,0	6,0	1,0	
	Max	29,0	38,0	28,0	5,0	39,0	39,0	
CD62P <i>nach</i> TF S, (%)	MW	100,0	96,6	98,0	96,7	99,0	97,8	nein (p=0,626)
	SFMW	0,0	1,7	0,5	1,2	0,4	0,5	
	Min	100,0	88,0	95,0	95,0	97,0	88,0	
	Max	100,0	100,0	99,0	99,0	100,0	100,0	
[CD62P <i>nach</i> TF] (%)	MW	72,0	74,0	88,5	93,3	78,0	81,5	(p<0,05) Tag 3-4&5
	SFMW	1,0	3,5	3,3	2,4	5,8	2,4	
	Min	71,0	62,0	69,0	90,0	60,0	60,0	
	Max	73,0	86,0	97,0	98,0	92,0	98,0	

US Unstimuliert; S Stimuliert; [] Differenz von Stimuliert und Unstimuliert; MW Mittelwert; SFMW Standardfehler des Mittelwertes; TF-Tag Transfusionstag; Prod. Tag Produktionstag; \*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

Wie aus der Abbildung 11 und Tabelle 27 hervorgeht, waren die Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen der stimulierten und unstimulierten CD62P-positiven PLT *nach* TF an den jeweiligen TAK-Alterungstagen 3 bis 6 und hinsichtlich des gesamten Mittels über alle

Alterungstage hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Am Tag 2 zeigte sich diesbezüglich eine Signifikanz von  $p < 0,01$ .

**Tabelle 27** Darstellung des Gruppenvergleiches der CD62P-positiven TAK-PLT *nach* TF in %, Betrachtung der Unterschiede von US zu S jeweils an den gleichen TAK-Alterungstagen und des gesamten Mittels, (p) Signifikanz der Gruppenpaare zueinander.

Berechnung von Gruppenpaaren	Alter TK (d)	2	3	4	5	6*	gesamtes Mittel
	Anzahl (n)	2	7	8	3	6	26
<b>CD62P <i>nach</i> TF</b> US zu S <sup>s</sup>	Signifikanz (p) der MW-Abweichung	0,009	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001

<sup>s</sup>US Unstimuliert; S Stimuliert; \*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

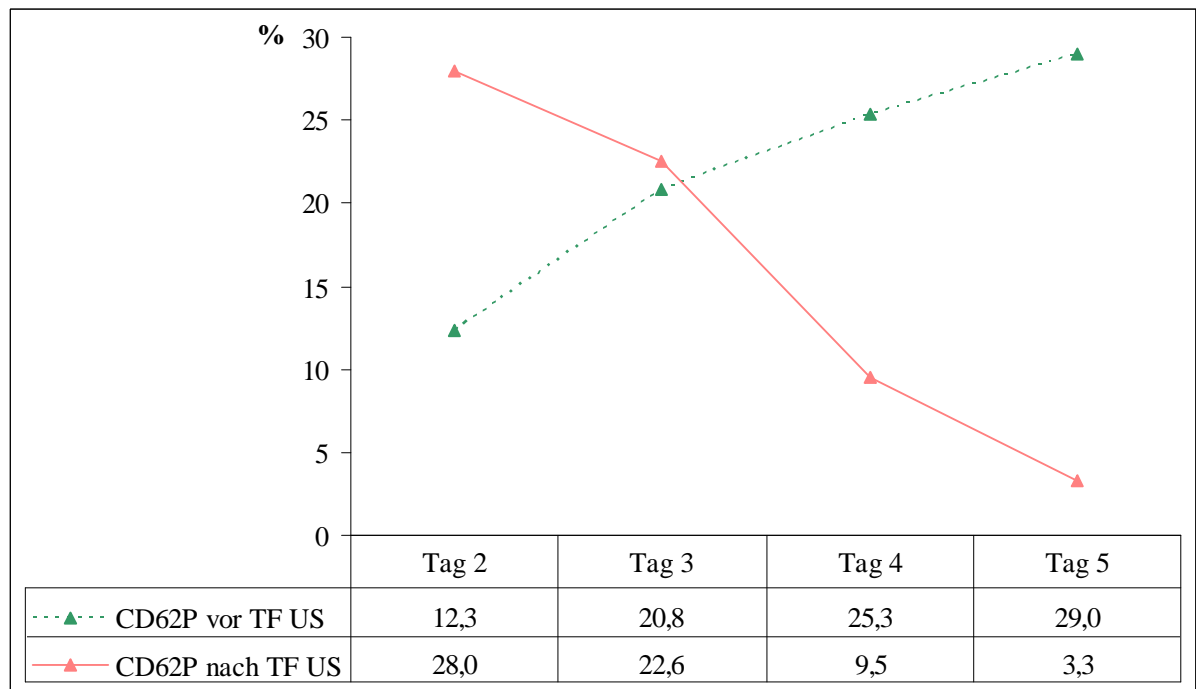
### 5.5.3 Darstellung von CD62P der TAK-PLT *vor* TF (US) gegenüber CD62P der TAK-PLT *nach* TF (US)

Bei Betrachtung des gesamten Mittels über alle Alterungstage fiel der prozentuale Anteil der unstimulierten CD62P-positiven Zellen (US) *nach* TF invers zu dem Anteil selbiger TAK-PLT *vor* TF sehr signifikant ab ( $p < 0,01$ ). Ferner zeigte sich beim Vergleich der prozentualen Anteile der unstimulierten CD62P-positiven Zellen (US) *vor* TF gegenüber den entsprechenden *nach* TF innerhalb des jeweiligen Alterungstages am Tag 2 und 4 ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied. An den Tagen 3, 5 und 6 konnte kein signifikanter Unterschied konstatiert werden (siehe Tab. 28 und Abb. 12).

**Tabelle 28** Darstellung des Gruppenvergleiches der CD62P-positiven TAK-PLT *vor* und *nach* TF in %, Betrachtung der Unterschiede von US zu US jeweils an den gleichen TAK-Alterungstagen und des gesamten Mittels, (p) Signifikanz der Gruppenpaare zueinander.

Berechnung von Gruppenpaaren	Alter TK (d)	2	3	4	5	6*	gesamtes Mittel
	Anzahl (n)	2	7	8	3	6	26
<b>CD62P <i>vor</i> TF (US)</b> zu <b>CD62P <i>nach</i> TF (US)</b>	Signifikanz (p) der MW-Abweichung	<0,001	0,888	<0,001	0,071	0,087	0,004

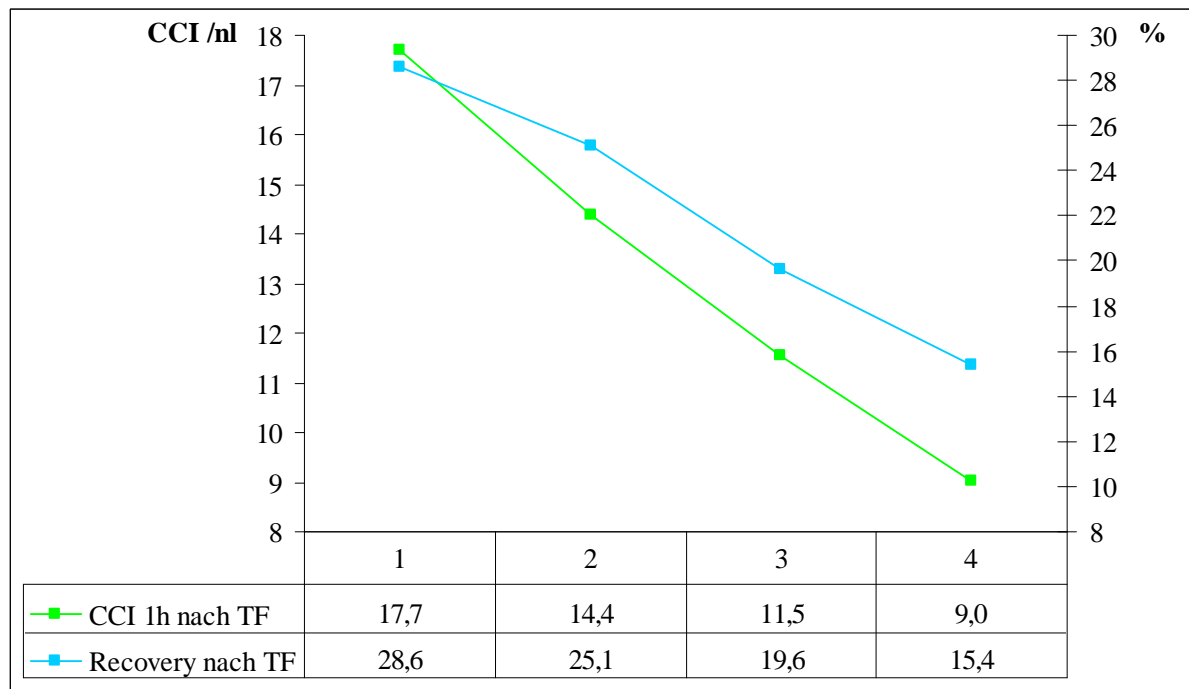
<sup>s</sup>US Unstimuliert; \*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.



**Abbildung 12** Verwendung der CD62P-Untersuchung, Übersichtsdarstellung bei getrennter Achsendarstellung der unstimulierten CD62P-positiven TAK-PLT *vor* und *nach* TF in %, US Unstimuliert 1 Stunde *nach* TF. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 23, 26 und 28 dargestellt.

#### 5.5.4 Darstellung des CCI und der Recovery 1 Stunde *nach* TF als derzeitigen Standard zur Beurteilung der Wirksamkeit von TAK-PLT *nach* TF

Anhand der Abbildung 13 ist deutlich zu erkennen, dass das korrigierte Inkrement (CCI) fast linear von 17,7 am Tag 2 auf 9,0 am Tag 5 der PLT *nach* TF mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  abfiel. Die Recovery korrelierte hierzu mit  $r = 0,99$  und sank von 28,6% am Tag 2 auf 15,4% am Tag 5 ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ); siehe Tab. 29.



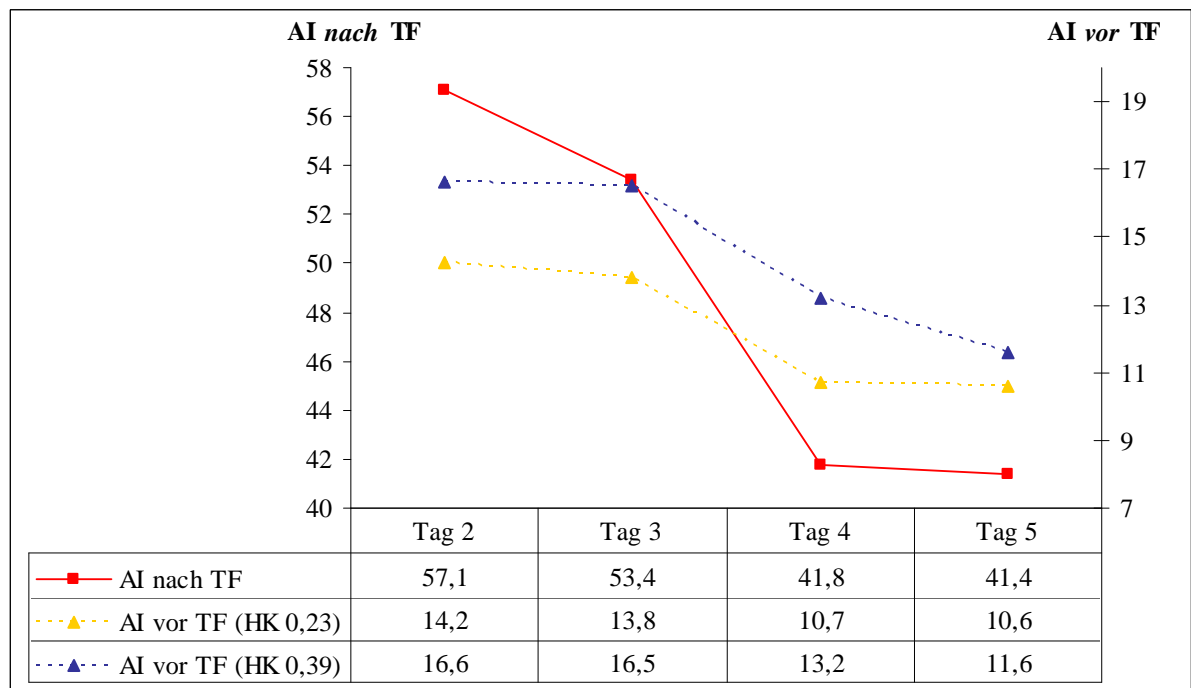
**Abbildung 13** Grafische Darstellung des CCI ( /nl) und der Recovery (%) der TAK-PLT 1 Stunde nach TF. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 29 dargestellt.

**Tabelle 29** Darstellung des CCI und der Recovery der TAK-PLT nach TF.

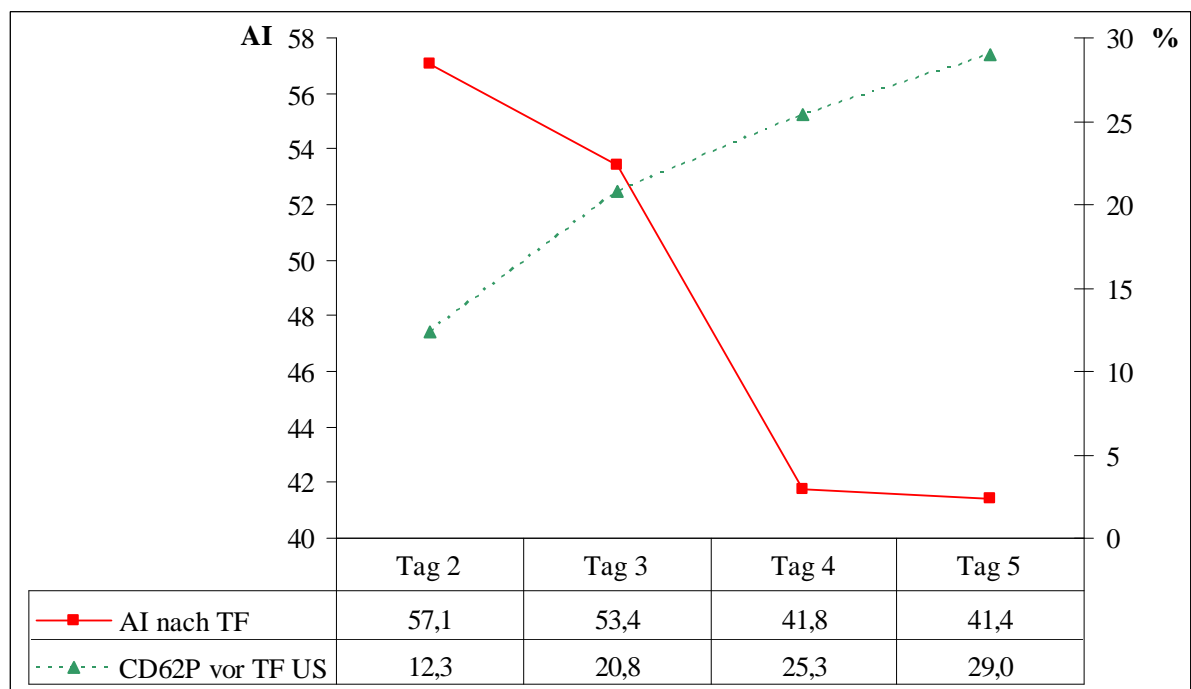
Alter TAK (d)		2	3	4	5	6*	Alle	Signifikanz
Anzahl (n)		15	25	25	19	9	93	
CCI (/nl) <sup>\$</sup>	MW	17,7	14,4	11,5	9,0	6,4	12,6	(p<0,05) Tag 2-5
	SFMW	3,6	1,6	1,2	0,9	1,2	0,9	
	Min	4,0	2,3	5,6	5,4	4,7	2,3	
	Max	49,3	30,2	24,3	19,1	8,6	49,3	
Recovery (%) <sup>\$</sup>	MW	28,6	25,1	19,6	15,4	11,6	21,4	(p<0,05) Tag 2-5
	SFMW	5,6	2,8	1,9	1,6	2,1	1,5	
	Min	6,9	3,8	9,7	9,5	8,7	3,8	
	Max	78,7	49,8	39,2	34,1	15,6	78,7	

<sup>\$</sup>1 Stunde nach TF; MW Mittelwert; SFMW Standardfehler des Mittelwertes; TF-Tag Transfusionstag; Prod. Tag Produktionstag; \*siehe Votum 38 vom 09. Juni 2008, RKI.

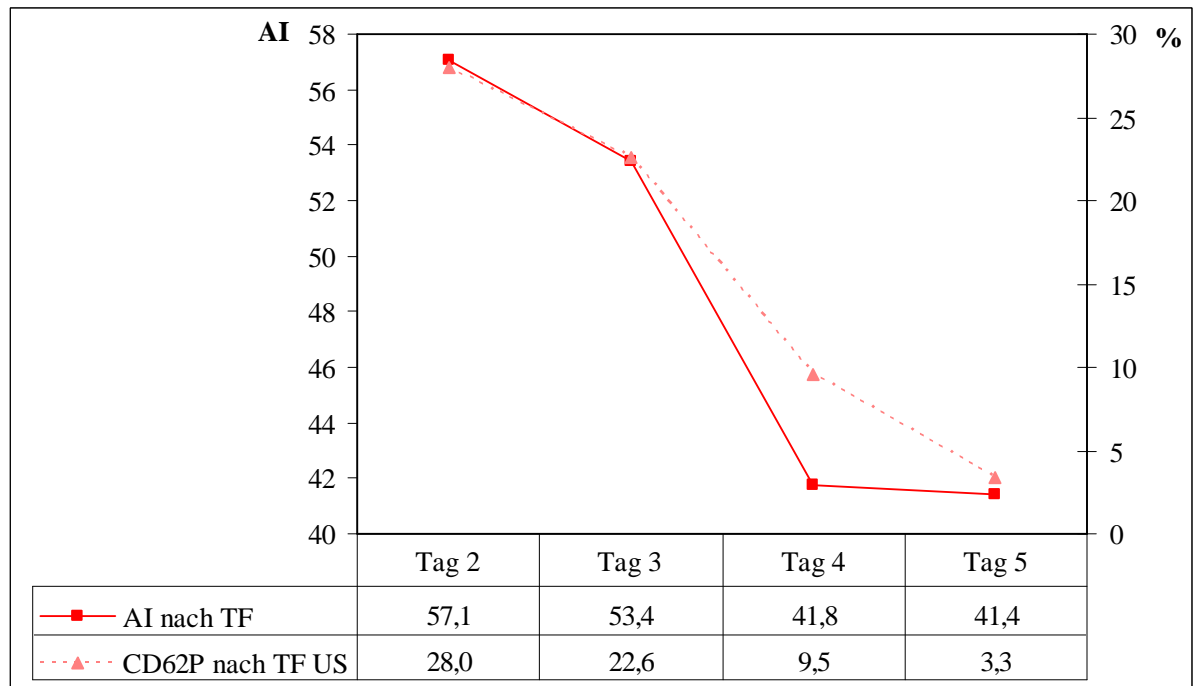
## 5.6 Diagrammübersichten



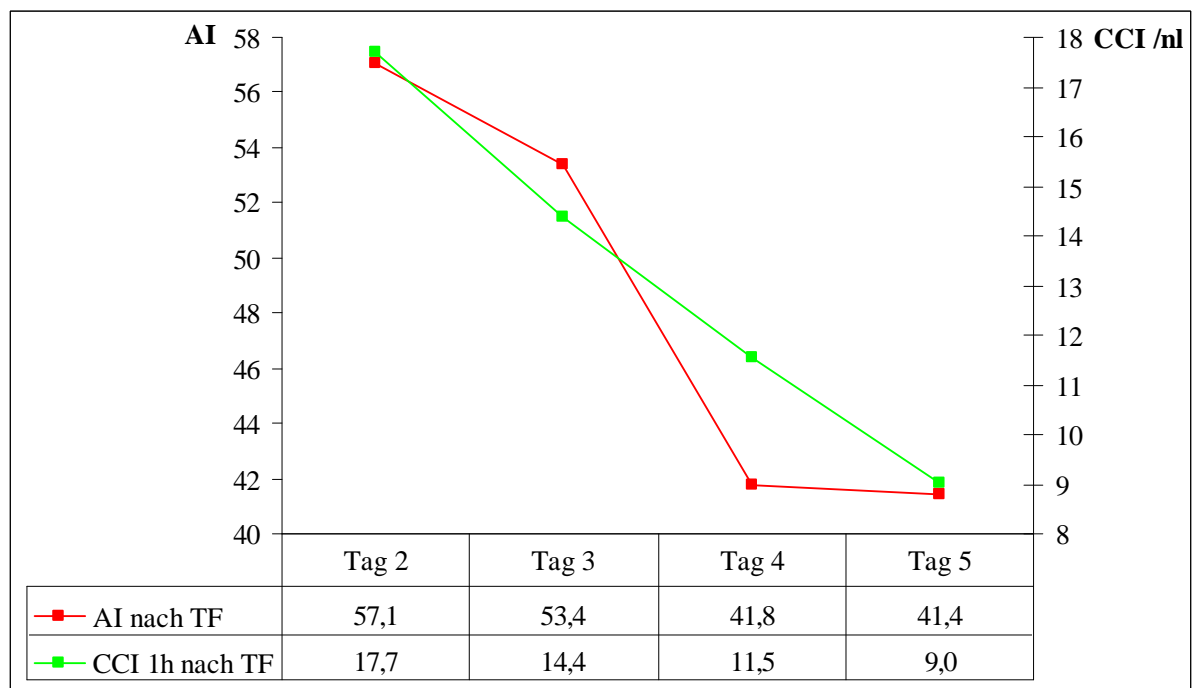
**Abbildung 14** Verwendung des Pada, Übersichtsdarstellung bei getrennter Achsendarstellung der AI der TAK-PLT *vor* TF und des AI der TAK-PLT *nach* TF. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 21, 22 und 25 dargestellt.



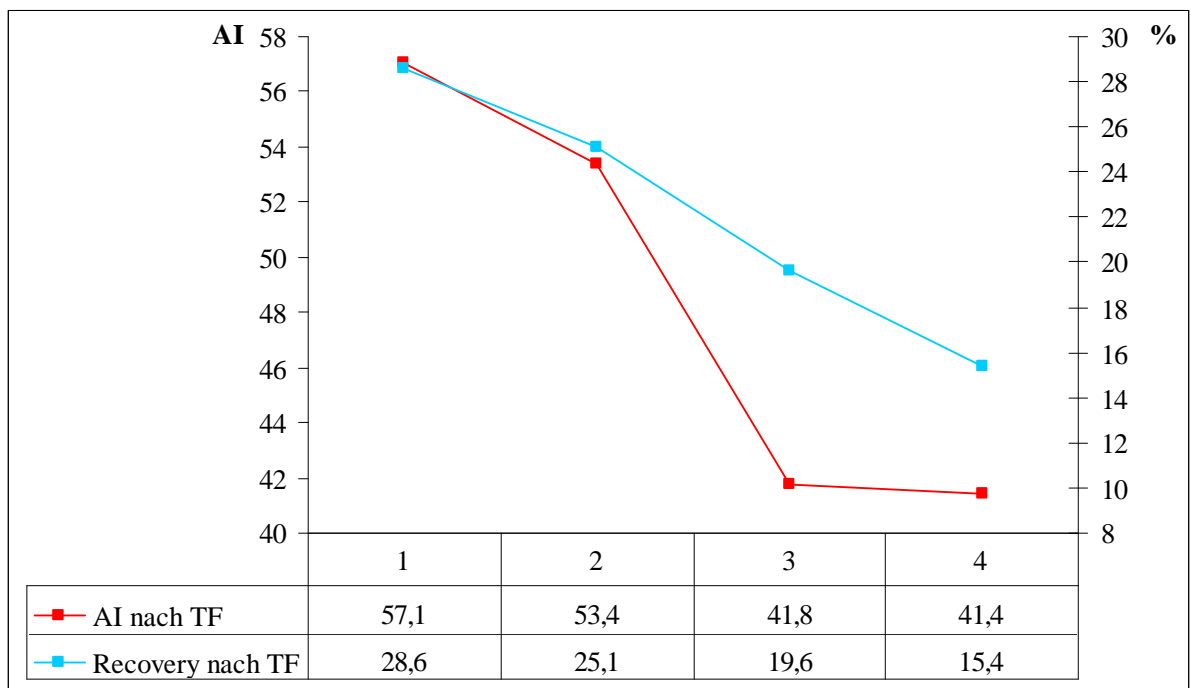
**Abbildung 15** Verwendung des Pada und der CD62P-Untersuchung, Übersichtsdarstellung bei getrennter Achsendarstellung des AI der PLT *nach* TF und der unstimulierten CD62P-positiven TAK-PLT *vor* TF in %, US Unstimuliert. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 23 und 25 dargestellt.



**Abbildung 16** Verwendung des Pada und der CD62P-Untersuchung, Übersichtsdarstellung bei getrennter Achsendarstellung des AI der TAK-PLT *nach* TF und der unstimulierten CD62P-positiven TAK-PLT *nach* TF in %, US Unstimuliert. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 25 und 26 dargestellt.



**Abbildung 17** Verwendung des Pada, Übersichtsdarstellung bei getrennter Achsendarstellung des AI der TAK-PLT *nach* TF sowie des CCI ( /nl) 1 Stunde *nach* TF. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 25 und 29 dargestellt.



**Abbildung 18** Verwendung des Pada, Übersichtsdarstellung bei getrennter Achsendarstellung des AI der TAK-PLT *nach* TF sowie der Recovery (%) 1 Stunde *nach* TF. Die entsprechenden Signifikanzen, SFMW, Minimal- und Maximalwerte sind in Tabelle 25 und 29 dargestellt.



## 5.7 Untersuchung von möglichen Einflussfaktoren auf den AI der PLT *nach* TF

Im Speziellen wurde statistisch überprüft, ob folgende Faktoren den AI der PLT *nach* TF an die Patienten beeinflussten:

- Geschlechtszugehörigkeit,
- Diagnose der Patienten,
- autologe oder allogene PBSZT,
- Blutgruppenkompatibilität der transfundierten TAK,
- Chemotherapeutikum ATG,
- ausgewählte Laborwerte (Entzündungsparameter: Temperatur, CRP, Fibrinogen, Hämatologie).

Insgesamt wirkte sich keiner der benannten Faktoren signifikant auf den AI der PLT *nach* TF auf (siehe Tab. 30).

**Tabelle 30** Darstellung ausgewählter Faktoren und deren Einfluss auf den AI, (p) Signifikanzniveau.

Faktor		signifikanter Einfluss (p)
Geschlecht		p= 0,344
Diagnose		p= 0,554
Therapie (Autolog/Allogene)		p= 0,669
BG-Kompatibilität		p= 0,425
Chemotherapie (ATG)		p= 0,951
Temperatur	8 Uhr	p= 0,860
	12 Uhr	p= 0,645
	16 Uhr	p= 0,318
	20 Uhr	p= 0,618
Hämatologie	HK	p= 0,673
	Erythrozyten	p= 0,674
	Leukozyten	p= 0,335
	Thrombozyten	p= 0,850
	MPV	p= 0,836
	Fibrinogen	p= 0,530
Serum	CRP	p= 0,330

## 6 Diskussion

### 6.1 Allgemeines

Um eine einwandfreie Therapie mit Thrombozyten zu gewährleisten, sind standardisierte Thrombozytenfunktionstests *in vitro* (Probe aus dem TAK *vor* TF) als auch *ex vivo* (Patientenblutprobe *nach* PLT-TF) unabdingbar, um aus klinisch-therapeutischen und letztlich auch ökonomischen Gesichtspunkten eine optimale Versorgung sicher zu stellen. Die Suche nach einem einfachen *in vitro* Thrombozytentest, welcher die *in vivo* Funktion, die quantitative Recovery und die Überlebensrate gelagerter PLT für die Transfusion evaluiert, ist eine der wichtigsten Herausforderungen der Transfusionsmedizin und wird auch als der „Heilige Gral“ der Transfusionsmedizin bezeichnet (Snyder 1992). Der in unserer Untersuchung verwendete Plättchen-Adhäsionstest PADA ist ein Meilenstein auf diesem Wege. Denn er gibt Aufschluss über die aktuelle Thrombozytenfunktion *in vivo* und *in vitro* und bietet ferner die Möglichkeit zur einfachen Berechnung der Recovery und des CCI aufgrund der bei dem Testverfahren ermittelten Thrombozytenzahlen der PLT *vor* als auch *nach* TF. Einmalig ist auch die Untersuchung von PLT *vor* TF (*in vitro*) und selbiger *nach* TF (*ex vivo*). Dies konnte modellhaft an Patienten realisiert werden, welche sich aufgrund ihrer Konditionierung in der Knochenmarkaplasie befanden und folglich keine eigenen Thrombozyten bilden konnten. Demnach war auch ihre Milzreserve für PLT vollends ausgeschöpft, was sicherstellte, dass wirklich nur die Funktion der transfundierten TAK-PLT gemessen wurde.

### 6.2 Aktuelle Qualitätsbestimmungsmethoden von PLT *vor* und *nach* TF

Für die Herstellung, Lagerung und den Transport von TAK *vor* TF sind von der Bundesärztekammer notwendige Qualitätskontrollen vorgeschrieben, welche bereits im Kapitel 2.8.3. „Qualitätssicherung und Bestimmungen“ erwähnt wurden. So war bei allen TAK kurz *vor* TF ein „Swirling“ feststellbar. Es korreliert gut mit dem Überleben der PLT. Ein Verlust ist assoziiert mit morphologischen Veränderungen und Verringerung der Lebensfähigkeit von PLT. (Rinder et al. 2003, Hesse et al. 2001, Norfolk et al. 1998, Bertolini und Murphy 1996).

Die Plättchenkonzentration der TAK entsprach mit einer mittleren Konzentration von 1091,3 PLT/l dem geforderten Limit des Herstellers von 1400 PLT/l für die von uns verwendeten Lagerungsbeutel. Bei dieser Konzentration gewährleistet der Hersteller eine Haltbarkeit der

TAK von 5 Tagen. Bei der Kontrolle der Thrombozytenkonzentration ergab sich ein signifikanter Abfall zwischen dem Herstellungstag der TAK und dem jeweiligen TF-Tag. Dies könnte mit der lagerungszeitabhängigen zunehmenden Aktivierung und der damit verbundenen Aggregation der PLT bzw. einer Größenzunahme der PLT verbunden sein (siehe unten). Thrombozytenaggregate bzw. stark vergrößerte PLT werden bei der Thrombozytenmessung im Cell Count Gerät nicht mit erfasst, woraus eine Abnahme der Plättchenzahl resultiert. Singh et al. 2003 schrieb PLT mit einem hohen MPV eine bessere funktionelle Aktivität zu.

Die weiteren Prüfparameter Volumen, Thrombozytengehalt, Restleukozyten, Resterythrozyten, pH-Wert und Sterilität wurden entsprechend den Anforderungen kontrolliert. Sie lagen alle im Normbereich. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die in der aktuellen Literatur beschriebenen Beeinträchtigungen der PLT im TAK aufgrund von etwaigen Normabweichungen der Prüfparameter für diese Untersuchung nicht relevant waren.

Obwohl der lagerungsabhängig fortschreitende Thrombozytenfunktionsverlust, begleitet von morphologischen Veränderungen, bereits von zahlreichen Autoren beschrieben wurde (Shrivastava 2009), muss bisher kein Thrombozytenfunktionstest als Nachweis bzw. zur Beurteilung der notwendigen Qualität der Plättchen im TK routinemäßig erbracht werden. Lediglich zur Produktneueinführung hat seitens des PEI ein Qualitätsnachweis des jeweiligen Produktes zu erfolgen. Relativ häufige Verwendung findet die hypotone Schockreaktion (HSR) und der extent shape change (ESC). Diese korrelieren gut mit der Überlebenswahrscheinlichkeit von PLT in vivo (Holme et al. 1998). Eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien mit der HSR ist jedoch schwierig, da eine Standardisierung der Methode fehlt (Cardigan und Williamson 2003). Allerdings weisen auch aktuelle Studien mittels dieses Testprinzips einen Adhäsionsverlust von gelagerten TK-PLT nach (Tynngard et al. 2008). Weitere Methoden, wie die Analysen der Plättchenfunktionen mit dem Cone Platelet Assay (CPA) und Clot Signature Analyzer (CSA), sind sehr aufwendig in der Durchführung. Eine andere Methode, wie der Homburger Retentionstest, ist für die Analyse der PLT im Konzentrat wegen der Notwendigkeit von rHirudin ungeeignet. Weitere anerkannte Tests sind der Aggregationstest mit Kollagen und ADP, der Platelet Function Assay (PFA) 100, der Rapid Platelet Function Assay (RPFA) und auch die in unserer Untersuchung verwendete Durchflusszytometrie. Beispielsweise konnten Bock et al. 2002 zeigen, dass bei der Messung der Adhäsion der PLT in TK mit dem PFA 100 an Kollagen bzw. ADP, die PLT lagerungsabhängig die Fähigkeit zur Adhärenz nahezu verlieren. Bei allen zuletzt erwähnten Tests erweist sich der zusätzliche Gebrauch von Agonisten als nachteilig, da konsekutiv nur indirekt eine Aussage zur momentanen Thrombozytenfunktion

getroffen werden kann. Zudem obliegt ihnen ein großer technischer Aufwand verbunden mit hohen Kosten. Im Routinebetrieb sind sie daher äußerst schwierig durchzuführen. Deshalb finden sie meist nur zu Validierungszwecken Verwendung.

Die Wirksamkeit von PLT *nach* TF (in vivo) wird derzeit anhand der Recovery und dem CCI und selten an der Überlebenszeit transfundierter PLT gemessen (Shrivastava 2009). Schon 1984 postulierte Tomasulo, dass jede Thrombozytentransfusion ohne Anstieg der Plättchenzahlen beim Empfänger einen unbedingt zu vermeidenden Fehler darstellt, da der weltweite Mehrbedarf an Thrombozytenpräparaten kaum noch zu befriedigen ist (Tomasulo und Lenes 1984). Denn als wichtigstes Beurteilungskriterium des Transfusionserfolges wird aktuell der Anstieg der Thrombozytenzahl im peripheren Blut, das Inkrement, angesehen. Das korrigierte Inkrement (CCI) errechnet sich aus Körperoberfläche und transfundierter Thrombozytenmenge. Als günstigster Kontrollzeitpunkt hat sich die Zeit zwischen 18-24 Stunden nach Thrombozytentransfusion erwiesen (Consensus Conference 1987). Die Bestimmung nach 24 Stunden war uns nicht möglich, da erkrankungsbedingt die Plättchenzahl sehr schnell abfiel und daher häufig mehrmals täglich transfundiert werden musste. Ein CCI von  $<7,5 \times 10^9/l$  nach 1 Stunde oder  $<4,5 \times 10^9/l$  nach 20 bis 24 Stunden wird als Transfusionsmisserfolg gesehen (Norfolk et al. 1998).

Einen klinischen Erfolg der Thrombozytentransfusion stellt der Stillstand einer Blutung nach therapeutischer Applikation dar. Die Blutungszeit ist der bisher einzig sichere Funktionsnachweis von TK-PLT *nach* TF. In der Routine kann er jedoch aus ethischen Gründen und als nicht standardisiertes Testverfahren nicht eingesetzt werden.

Zudem spielt die Milz als Thrombozytenspeicher (bis 30%) für die Recovery der transfundierten PLT im peripheren Blut eine entscheidende Rolle. Die Recovery sollte zwischen 60 bis 70% betragen (Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008). Eine Milzvergrößerung (Splénomegalie) kann die Recovery im Gegensatz zur Milzentfernung (Splenektomie) um 15 bis 20% verringern (Novotny 1999) und tritt z.B. im Kontext von akuten und chronischen Leukämien und Lymphomen auf. Ein leerer Milzspeicher sowie die Splénomegalie, wie bei den Patienten unserer Untersuchung, führt sehr wahrscheinlich zu einer schnelleren Abwanderung der transfundierten PLT im Vergleich zu einem vollen Milzspeicher bzw. gegenüber splenektomierten Patienten. Ein Grund weswegen Kritiker das CCI und die Recovery für diese Patientengruppe als keine geeigneten Qualitätskriterien ansehen. Denn eine normale Plättchenwiederfindungsrate von 50-70% und ein Überleben von 8-10 Tagen kann bei thrombozytopenischen Patienten, wie in unserer Studie, nicht erwartet werden (de Wildt-Eggen und Gulliksson 2003). Außerdem können z.B. Medikamentenwechselwirkungen, verschiedene Gerinnungserkrankungen (Koagulopathien) und immunologische Prozesse zu einem Transfusionsmisserfolg führen.

Diese Untersuchungen machen allerdings keine Aussagen über die Funktionsfähigkeit, wie die Adhäsivität, von PLT. Wie bereits erwähnt, wird die Recovery maßgeblich von der Milzfunktion als auch deren Größe bestimmt. Des Weiteren werden aktivierte Thrombozyten bevorzugt aus der Zirkulation entfernt (Cetin et al. 2001, Holme et al. 1997, Metzelaar et al. 1993, George 1992, Rinder und Snyder 1992, Triulzi et al. 1992, Rinder et al. 1991b, Bode 1990, Larsen et al. 1989), was die Recovery bzw. das CCI zusätzlich senken.

Zusammenfassend sollten laut Rinder et al. 2003 Thrombozyten innerhalb von 24 bis 48 Stunden übertragen werden, da diese normalerweise ein gutes CCI und eine gute Funktion aufweisen. Die Blutungszeit wird jedoch als einziger Parameter für die funktionelle Kapazität der PLT in vivo beschrieben (Eriksson et al. 1996). Doch letztendlich ist der ex vitro Qualitätsnachweis transfundierter PLT noch immer sehr schwierig. Aus den eben genannten Gründen ist die Verbesserung der Herstellung von TK und deren Überwachung unabdingbar. Meine Arbeit will unter kombinierter Verwendung von standardisierten in vitro und ex vivo Untersuchungsmethoden diesem Problem entgegenwirken.

### **6.3 Der Adhäsionsindex (AI) *vor* und *nach* TF mittels PADA**

Um die dringende Notwendigkeit eines Thrombozytenfunktionstests für den Qualitätsnachweis von TAK-PLT zu untermauern, wurde für diese Untersuchung der PADA angewandt. Die Untersuchung richtete dabei den Fokus auf die sich über die Lagerungszeit verändernde Adhäsionsfähigkeit von Plättchen in TAK. Denn der PADA rückt die essentielle Bedeutung von GP IIb/IIIa in Verbindung mit Fibrinogen für das Adhäsions- und Aggregationsprozedere von PLT in den Vordergrund. Das Besondere hierbei ist, dass der Test ohne den Zusatz von Agonisten gelingt, sowohl mit PLT aus TAK als auch im citrierten Vollblut. Dies ermöglicht direkt eine quantitative Aussage über die aktuell vorliegende Plättchenadhäsivität (Schumann et al. 2004), welche mittels PADA schnell, einfach und obendrein sehr kostengünstig bestimmt werden kann. Der Test ist weiterhin standardisierbar und reproduzierbar. Zum einen wurde der Adhäsionsindex (AI) bei PLT *vor* TF bestimmt. Zum anderen erfolgten Messungen derselben PLT *nach* TF. Der Referenzwert für citriertes Vollblut beträgt  $50 \pm 11$ . Bei der Messung des AI der TAK-PLT *vor* TF als auch *nach* TF konnte über das gesamte Mittel über alle Alterungstage der Lagerungszeit, gemessen an Tagen 2, 3, 4 und 5, jeweils eine hochsignifikante Abnahme der Adhäsionsfähigkeit ermittelt werden. Besonders gravierend zeigte sich dabei ein Abfall des AI ab einer Lagerungszeit von mehr als 3 Tagen. Er lag bei den TAK-PLT *vor* TF am Tag 2 durchschnittlich bei  $14,2 \pm 0,9$ , am Tag 3 bei  $13,8 \pm 1,1$  und fiel bis zum Tag 4 auf einen Wert von  $10,7 \pm 1,1$  ab. Noch

eindrücklicher erwiesen sich die Messdaten der TAK-PLT *nach* TF: Der Tag 2 ergab einen AI von  $57,1 \pm 3,4$  und der Tag 3 lag noch relativ hoch bei  $53,4 \pm 2,5$ . Am Tag 4 sank er jedoch einbruchartig auf einen Wert von  $41,8 \pm 3,3$  ab ( $p < 0,01$ ). Bei den Versuchen mit dem PADA an TAK-PLT *vor* und *nach* TF hat sich gezeigt, dass sich die Adhäsivität der PLT mit der Zunahme der Lagerungszeit deutlich verschlechtert. Mit diesem Funktionstest konnten somit die Ergebnisse anderer Untersuchungen bestätigt werden, bei welchen ebenfalls frische PLT gegenüber 4 Tage alten TK-PLT eine optimale Aggregation sowie eine erhöhte Freisetzung dichter Granula demonstrierten (Rosenfeld et al. 1995a), welche ihrerseits zur Aktivierung führten oder diese forcierten (Offermanns 2006, Gachet 2001, Ruggeri 1994, Siess 1989). Eine klinische Studie von Borzini et al. 1999 hat in Bezug auf die funktionellen Eigenschaften während der Lagerung von PLT eine Zunahme der *in vitro* Blutungszeit mit dem PFA 100TM ermittelt. Sie betrug 94 sec am Tag 0 und 89 sec am Tag 3 der Lagerung. Am Tag 4 kam es zu einem rasanten Anstieg auf 177 sec. Am Tag 6 der Lagerung ist die vom Hersteller als maximal definierte Blutungszeit von 300 sec überschritten worden. Resümiert scheinen mit Tag 4 der Lagerung die PLT den Ergebnissen zufolge mehr und mehr die Fähigkeit zur Adhäsion zu verlieren.

Die erhobenen Daten der TAK in dieser Arbeit beziehen sich auf die CaridianBCT®. Unterschiedliche Herstellungsverfahren von TK-PLT, wie Apherese oder Poolpräparation, führen per se zu einem signifikant unterschiedlichen AI, was in einer hausinternen Studie gezeigt werden konnte (Althaus 2006). Stephan et al. 2004 beschrieben hierzu die ADP induzierte Plättchenaggregation am Tag 5 der Lagerung von verschiedenen Zellseparatoren. So wies die Haemonetics MCS+ mit CPD eine Aggregationsfähigkeit von 59,4% auf. Bei der Haemonetics MCS+ mit ACD-A (Acid-Citrat-Dextrose, Lösung A [Citrat]) betrug die Aggregationsfähigkeit 24,6%. Die CaridianBCT® lag mit 12,4% auch hier niedriger als die gepoolten TK aus Buffy Coats (BC-TK) mit CPD von 20,7% und war daher vergleichbar mit den adhäsiven Eigenschaften bei den Untersuchungen von TAK-PLT *vor* TF mit dem PADA (Althaus 2006). Hier konnte der Referenzwert von  $50 \pm 11$  an keinem Tag der Lagerung in den TAK *vor* TF erreicht werden. Dies könnte auf veränderte Milieubedingungen bzgl. der Citratantikoagulation der TAK-PLT im autologen Plasma zurückzuführen sein. Bereits Gear 1994 beobachtete die signifikant erniedrigte Adhäsivität in Anwesenheit des Antikoagulanz ACD-A. Dieses bindet Calciumionen, welches eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion der PLT-Aktivierung spielt (Stefanini et al. 2009), wie zum Beispiel beim GP IIb/IIIa Rezeptor. In ihm wird aufgrund eines essentiellen calciumionenhaltigen Milieus durch Konformationsänderung ein bindungsfähiger Zustand für freies Fibrinogen erlangt. Die Stimulierung der PLT mit verschiedenen Agonisten führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration infolge der Aktivierung des Eintritts von

Calciumionen durch den Plasmamembrankanale (Rosado et al. 2001). Citrat verringert die extrazelluläre Konzentration des ionisierten Calciums um ein Vielfaches. Das senkt wiederum die Affinität von Fibrinogen an das GP IIb/IIIa aktivierter PLT zu binden (Phillips et al. 1997). Zusammengefasst bewirkt das Citratmilieu ein verlangsamtes Reaktionsvermögen der PLT, gemessen an der Adhäsion (Wang et al. 1999, Gear 1994).

Bei Zugabe von Testerythrozyten (RBC) zu der PLT-Suspension von TAK *vor* TF kommt es zu einer Restauration dieser adhäsiven Eigenschaften im Gegensatz zu einer Suspension ohne RBC. Dies konnte durch Untersuchungsergebnisse von Rummler 2005 bestätigt werden. Bei Zusatz von RBC zur Suspension gelagerter TAK-PLT *vor* TF konnte bei Verlängerung der Reaktionszeit des PADA von 0 auf 2 Stunden eine signifikante Zunahme des AI beobachtet werden, wobei der Einfluss der RBC auf den AI und damit des Hämatokrits größer ist als der der Inkubation (Rummler 2005).

Die soeben beschriebene Abhängigkeit des AI vom Hämatokrit konnte in unserer Studie ebenfalls gezeigt werden. Dieser Einfluss der RBC auf die Adhäsivität im TAK blieb über die gesamte Lagerungszeit konstant. Hierzu wurde der Vergleich des Hämatokrits der Patienten (im Mittel 0,23) mit einem niedrigen physiologischen Hämatokritwert (im Mittel 0,39) am jeweiligen Alterungstag der TAK-PLT *vor* TF gewählt. Durchschnittlich konnte ein Anstieg des AI um 17,2% erreicht werden ( $p < 0,001$  im gesamten Mittel über alle Alterungstage). Alkhamis et al. 1990 zeigten, dass bei einem Schwellenhämatokrit von 0,25 bis 0,35 die Erythrozyten, suspendiert im plättchenreichen Plasma, eine größere Beteiligung an der Plättchenadhäsion und Plättchenaggregation hatten als die PLT selbst. Demzufolge kann die Forderung von Norfolk et al. 1998 unterstützt werden. Nach seinen Erkenntnissen sollte bei Patienten *vor* der Thrombozytentransfusion mindestens ein Hämatokrit von 0,30 erreicht werden, um optimale Voraussetzungen für die funktionellen Eigenschaften der PLT zu schaffen. Klinisch kommt es durch die Erythrozytengabe unter anderem zu einer Korrektur der pathologischen Blutungszeit (Blajchman 2003). In diesem adhäsionsverbessernden Prozess sind sowohl physikalische als auch chemische Effekte von roten Zellen verwickelt (Weiss 1995). Denn intakte RBC verstärken die Plättchenaktivierung durch Zell-Zell-Interaktionen zwischen ihnen und den PLT mittels Gewährleistung von rheologischen Eigenschaften, die dem Vollblut ähnlich sind. So wird der Transport zu den Partikeloberflächen verbessert und die Kollisionswahrscheinlichkeit von zwei Thrombozyten und zwischen PLT und Gefäßwand, in unserem Test zwischen PLT und Polymerpartikeln, erhöht.

Ein chemischer Effekt von RBC ist die Energielieferung durch die Abgabe von 65% des ADP. Die anderen 35% ADP stellen die PLT selbst bereit. Plättcheneigenes oder aus RBC abgegebenes ADP wiederum setzt rezeptorgesteuert Calciumionen aus der internen

Plättchenreserve frei (Mangin et al. 2004, Andre et al. 2003, Gawaz 2001, Bonnefoy et al. 2000) und ist substantiell für die scherstressvermittelte Plättchenantwort (Hassett 2002, Rosado et al. 2001, Kroll et al. 1996), indem es als Aktivator die Bindung von Fibrinogen an den GP IIb/IIIa Rezeptor ermöglicht (Bonnefoy et al. 2000, Kroll et al. 1996, Goldsmith et al. 1995, Weiss 1995, Alkhamis et al. 1990).

Darüber hinaus sind insbesondere die Bedeutung des erwähnten Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa und von Fibrinogen für den PADA zu nennen. Er ist das häufigste GP der Zytoplasmamembran (Gawaz 2001). Verwendet man EDTA anstatt des Citrats als Antikoagulan, bei sonst gleichem Versuchsaufbau, kann man die Abhängigkeit des Tests vom GP IIb/IIIa zeigen. Denn unter dem Einfluss von EDTA dissoziiert der Rezeptor in zwei gleich große Untereinheiten. Somit ist eine Adhärenz via GP IIb/IIIa nicht mehr möglich (Weisel et al. 1992). Dies kann auf die zentrale Rolle der Calciumionen für die Funktionsfähigkeit des Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa und von Fibrinogen für den PADA zurückgeführt werden. Calciumionen halten die beiden integralen Membranproteinkomplexe IIb und IIIa des GP zusammen. Außerdem werden sie für die Agonisten induzierte Konversion des GP Komplexes in einen funktionsfähigen Fibrinogenrezeptor benötigt (Shattil und Brass 1985).

Das Plasmafibrinogen ist eine weitere unabkömmliche Prärequisite für den PADA. Die Bindung von Fibrinogen an den GP IIb/IIIa Rezeptor ist ein spezifischer, zeitabhängiger und sättigender Prozess (Faraday et al. 1994). Lozano et al. 1997 stellten bei Stimulation von PLT mit Thrombin in 7 Tage gelagerten Thrombozytenkonzentraten eine 40% Verminderung der maximalen Fibrinogenbindung gegenüber frischen TK fest.

Bei unseren Patienten betrug die Blutkonzentration im Mittel 5,05-6,09g/l und lag somit über dem erforderlichen Referenzwert. Es ist das Plasmaprotein mit den besten Bindungseigenschaften an synthetische Oberflächen. An diese können zwar auch andere plasmatische Proteine, wie Fibronectin, Vitronectin und vWF binden. Sie spielen aber nur eine untergeordnete Rolle, da ihre Abwesenheit die Thrombozytenadhäsion nicht signifikant verschlechtert. PLT adhären kaum an mit Plasma benetzte Oberflächen (Tsai et al. 2002, Nagai et al. 1993). Die Adhäsion von PLT mittels Fibrinogen ist vom Scherrstress abhängig (Osende et al. 2001). Dabei bindet Fibrinogen bei niedrigen Scherraten ( $>300\text{s}^{-1}$  und  $<500\text{s}^{-1}$ ), was einem Scherstress von 12-18 dynes/cm<sup>2</sup> entspricht, besonders optimal an das GP IIb/IIIa. Der für den PADA verwendete Minishaker imitiert konstant diesen definierten physiologischen Scherrstress (15 dynes/cm<sup>2</sup>) und nutzt damit exakt das benötigte Wirkungsspektrum von Fibrinogen zur Adhäsionsvermittlung. 67% der PLT adhären bei diesem Scherstress (Bonnefoy et al. 2000, Murata et al. 1993). Bei Zu- oder Abnahme des



Scherrstresses erniedrigt sich der Anteil adhärierter PLT (Kulkarni et al. 2000, Kroll et al. 1996, Ryu et al. 1995, Ikeda et al. 1991).

#### **6.4 CD62P der TAK-PLT vor und nach TF sowie CCI und Recovery nach TF**

Der Aktivierungsvorgang von Thrombozyten führt zur Sekretion von  $\alpha$ -Granula mit Freisetzung der Inhaltstoffe und zur Verschmelzung von granulären Membrananteilen mit der Plasmamembran. Hierdurch wird CD62P auf der Oberfläche aktivierter Plättchen exprimiert und kann mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden (McEver und Martin 1984). Diverse Studien befassten sich mit der Untersuchung der Oberflächenexpression von P-Selektin als Folge der lagerungsbedingten Plättchenaktivierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Deitenbeck und Scharf 1998, Holme et al. 1997, Sloand et al. 1996, Bock et al. 1994, Metzelaar et al. 1993, Rinder et al. 1993, Scharf und Hanfland 1993, Rinder und Snyder 1992, Goodall 1991, Rinder et al. 1991a, Bode 1990, Fijnheer et al. 1990, Shattil et al. 1987). Übereinstimmend berichteten alle Autoren von einer lagerungsdauerabhängigen Zunahme der Oberflächenexpression dieses  $\alpha$ -granulären Glykoproteins als Folge der aktivierungsabhängigen Degranulation. Daher ist die durchflusszytometrische Bestimmung von P-Selektin ein geeigneter Parameter, um das Ausmaß einer thrombozytären Aktivierung zu untersuchen. Als Folge der Degranulation im Rahmen der Aktivierung verschmelzen die Membranen der  $\alpha$ -Granula mit der Plasmamembran, wodurch P-Selektin integraler Bestandteil der Thrombozytenoberfläche wird. Anschließend kann P-Selektin auf der Plättchenmembran nachgewiesen werden (McEver und Martin 1984). Aus diesem Grunde erlaubt die durchflusszytometrische Quantifizierung von P-Selektin Aussagen über den Anteil aktivierter Thrombozyten, die eine Sekretion durchlaufen haben. Zu Recht kann das P-Selektin als Marker für den Aktivierungszustand von Thrombozyten bezeichnet werden (Hesse et al. 2001, Rinder 1998). Diese Beobachtung im Rahmen der PLT- Aktivierung korreliert beispielsweise auch mit der Freisetzung von anderen Aktivierungsmarkern, wie dem  $\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ -TG, Kaplan 1994, Nicwiarowski et al. 1994, Bock et al. 1993, Bode et al. 1991), einem plasmatischen Marker für die in vivo-Aktivierung von Thrombozyten. Rinder et al. 1991a konnten darstellen, dass eine zunehmende Lagerdauer von PLT-TK eng mit dem Ausmaß der Plättchenaktivierung korreliert. Dies kann als Prozentsatz P-Selektin bzw. CD62P-positiver Thrombozyten ausgedrückt werden. In der erwähnten Studie stieg der Anteil unstimulierter PLT von durchschnittlich  $4\pm 2\%$  am Tag der Herstellung (Tag 1) auf  $25\pm 8\%$

am 5. Tag der Lagerung an. Ähnliche Ergebnisse erzielten ebenfalls andere Studien (Cetin et al. 2001, Holme et al. 1997) oder beispielsweise auch eine aktuelle von Chakroun et al. 2008. Der am ITM der FSU Jena durchflusszytometrisch gemessene prozentuale Anteil unstimulierter CD62P-positiver TAK-PLT *vor* TF lag zu Messbeginn am Tag 2 im Mittel bei  $12,3 \pm 1\%$  und stieg, analog zu Rinder et al. 1991b, im Verlauf der Lagerung am Tag 5 auf  $29,0 \pm 3,4\%$  sehr signifikant an ( $p < 0,01$ ). Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil an CD62P-positiven PLT nach Stimulation mit TRAP-6 ermittelt. Dieser lag am Tag 2 bei  $98,2 \pm 0,4\%$  und fiel nur geringfügig ohne signifikante Unterschiede auf  $95,0 \pm 0,6\%$  am Tag 5 der Lagerung ab ( $p = 0,056$ ). Im Gegensatz hierzu zeigten Hesse et al. 2001 zusätzlich einen signifikanten Abfall des prozentualen Anteils von CD62P-positiver PLT nach Stimulation mit  $91,8 \pm 3\%$  am Herstellungstag gegenüber dem Tag 5 mit  $71,2 \pm 12,4\%$ .

Ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis unserer Untersuchung war die Feststellung, dass sich der prozentuale Anteil unstimulierter CD62P-positiver TAK-PLT *nach* TF invers gegenüber *vor* TF verhielt und sich die MW im gesamten Mittel hoch signifikant voneinander unterschieden ( $p < 0,001$ ). Am Tag 2 lag der CD62P-positive Thrombozytenanteil *nach* TF bei durchschnittlich  $28,0 \pm 1$  und fiel zum Tag 5 auf  $3,3 \pm 1,2$  hin signifikant ab ( $p < 0,05$ ). In diesem Zusammenhang ist auch die signifikante Abnahme des Inkrements und der Recovery mit zunehmendem Alter der transfundierten TAK-PLT zu sehen ( $p < 0,05$ ). Auch nach Rinder et al. 2003 hatten frische PLT, die innerhalb von 24-48 Stunden übertragen wurden, durchschnittlich ein gutes CCI und eine gute Funktion. Bei uns lag das CCI 1 Stunde *nach* TF am Tag 2 gemittelt bei  $17,7 \pm 3,6/\text{nl}$ , die Recovery bei  $28,6 \pm 5,6\%$  und am Tag 5 errechnete sich ein CCI von  $9,0 \pm 0,9/\text{nl}$  und eine Recovery von  $15,4 \pm 1,6\%$ . Kluter et al. 1996 beschrieben in einer Studie eine Abnahme des CCI nach einer Stunde von 30% bei TK am Tag 5 der Lagerung gegenüber frischen Präparaten. Und AuBuchon et al. 2004 zeigten einen Rückgang der Recovery um gut 20% bei 5 Tage gelagerten TAK-PLT. Sowohl das CCI als auch die Recovery geben Hinweise auf das Zirkulationsverhalten von PLT. Inwieweit sich aufgrund der Zirkulation Aussagen zur Funktion in vivo von PLT treffen lassen, ist ungewiss (Murphy 2004, Corash 2003).

Der lagerungsabhängige Anstieg des CD62P und der ebenfalls lagerungsabhängige Abfall des CCI sowie der Recovery unserer Untersuchung bestätigen das Resultat von Rinder et al. 1991b nach dem die Wiederfindungsrate von In-111-markierten, autologen Plättchen eine Stunde *nach* Transfusion (TF) invers mit der P-Selektin-Expression korrelierte. Andere Untersuchungen zeigten zudem, dass die P-Selektin-Expression auf der Plasmamembran mit abnehmender Überlebensfähigkeit von Thrombozyten korreliert (Cetin et al. 2001, Holme et al. 1997, Metzelaar et al. 1993, George 1992, Rinder und Snyder 1992, Triulzi et al. 1992, Bode 1990, Larsen et al. 1989), da durch die P-Selektin-vermittelte Bindung an neutrophile

Granulozyten und Monozyten die Plättchen rascher aus der Zirkulation entfernt werden (Rinder et al. 1991a, Larsen et al. 1989). Denn über Oberflächenproteine wie P-Selektin können Thrombozyten den direkten physischen Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen vermitteln, z.B. in lymphatischen Organen (Diacovo et al. 1996) oder im Kapillarnetz bei akuten Lungenverletzungen (Pitchford et al. 2005) und so indirekt an der Immunabwehr und im Entzündungsprozess beteiligt sein; die Funktion von P-Selektin besteht unter anderem in der Kohäsion aktivierter, CD62P-positiver Plättchen mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Hamburger und McEver 1990). Ferner beschrieben aktuelle Untersuchungen von Cognasse et al. 2009, dass Spenderthrombozyten ab dem 3. Lagerungstag konstant eine PLT-Aktivierungsmarker-Expression aufweisen und diese mit Monozyten und B- und T-Lymphozyten interagieren. Rinder et al. 1991a bestätigten, dass CD62P-positive Plättchen *nach* TF bevorzugt aus der Zirkulation eliminiert werden, in erster Linie durch Monozyten und Makrophagen (Manfredi et al. 2009) des retikulo-endothelialen Systems (Larsen et al. 1989). Das könnte die Vermutung zulassen, dass ältere TK aufgrund ihrer erhöhten immunologischen Wirksamkeit für die Thrombozyten-getriggerte Antikörperbildung verantwortlich sind.

Ergänzend sei erwähnt, dass PLT unter in vitro Bedingungen ihre Funktionen einbüßen und aus bisher unklaren Gründen sterben. Dies scheint den Mechanismen des programmierten Zelltodes von nukleären Zellen zu ähneln und von Metalloproteinasen reguliert zu sein (Hartley 2007). Solch eine Apoptose könnte unter anderem auch durch bioaktive Substanzen, wie z.B. den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), die entweder durch die Kontamination von weißen Blutkörperchen (WBC) oder von den PLT selbst abgegeben werden, ablaufen (Leytin und Freedman 2003, Perrotta et al. 2003, Holme et al. 1997).

## **6.5 Fazit der Diskussion im Kontext der eigenen Ergebnisse: AI, CD62P, Recovery und CCI der TAK-PLT *nach* TF und deren Bedeutung für die TF**

Resümierend ist P-Selektin vorwiegend an immunologischen Prozessen und (in)direkt an der Eliminierung der PLT beteiligt und weniger an der Gerinnung. Ferner offenbart es keine Thrombozytenfunktion, wie die Adhäsion, sondern zeigt den prozentualen Aktivierungsgrad von PLT. Eine erhoffte Korrelation zwischen einer Voraktivierung (CD62P-positive PLT) und der Adhäsivität (AI) im jeweiligen TAK war in unserer Untersuchung nicht feststellbar. Das bedeutet, dass man von der Voraktivierung allein nicht auf die Funktion der PLT im einzelnen TAK schließen kann. Mit dem CD62P ist lediglich der zu erwartende Abfall des

CCI und der Recovery eruierbar. Des Weiteren kostet die durchflusszytometrisch bestimmte P-Selektin Untersuchung mit und ohne TRAP6-Aktivierung 2 bis 3fach soviel wie der PADA. Aus diesen Gründen kann die Bestimmung des CD62P keinesfalls einen Thrombozytenfunktionstest ersetzen, sondern stellt eine Ergänzung zu einem solchen dar. Der einfach durchzuführende und zudem sehr kostengünstige Funktionstest PADA sollte demnach praktische Anwendung im klinischen Alltag finden.

Die kausale Betrachtung und Interpretation der gewonnen Ergebnisse lässt sich hier nicht lückenlos darstellen. Sicher bleibt, je länger PLT gelagert sind, desto kürzer ist ihre anschließende Überlebenszeit (Rothwell et al. 1998). Denn eine zunehmende Lagerungszeit von TK führt zu einer gesteigerten Voraktivierung der Thrombozyten (Cetin et al. 2001, Deitenbeck und Scharf 1998, Holme et al. 1997, Sloand et al. 1996, Bock et al. 1994, Metzelaar et al. 1993, Rinder et al. 1993, Scharf und Hanfland 1993, Rinder und Snyder 1992, Goodall 1991, Rinder et al. 1991b, Bode 1990, Fijnheer et al. 1990, Shattil et al. 1987) und CD62P-positive und damit aktivierte Thrombozyten werden bevorzugt aus der Blutzirkulation entfernt (Manfredi et al. 2009, Rinder et al. 1991a). Außerdem hat eine z.B. lagerungsabhängig gesteigerte Voraktivierung einen Verlust wesentlicher metabolischer Thrombozytenfunktionen zur Folge. Sie verlieren ihre de novo Aggregationsmöglichkeit, und ihre Matrixadhäsivität ist gleichermaßen beeinträchtigt, was mit diversen in vitro Assays gemessen wurde, wie der Bestimmung der thrombozytären Adhäsionskapazität an subendothelialer Matrix oder an Kollagen (Seghatchian und Krailadsiri 1997, Rosenfeld et al. 1995a, Boomgaard et al. 1994). Des Weiteren sind in der Literatur inverse Korrelationen zwischen dem prozentualen Anteil CD62P-positiver PLT und der Überlebensrate bzw. der Wiederfindung von PLT *nach* TF beschrieben (Cetin et al. 2001, Holme et al. 1997, Metzelaar et al. 1993, George 1992, Rinder und Snyder 1992, Triulzi et al. 1992, Rinder et al. 1991b, Bode 1990, Larsen et al. 1989). Zum einen könnte dies in Zusammenschau mit unseren gewonnenen Ergebnissen eine Erklärung für den über die Lagerungszeit sinkenden AI und das abnehmende CCI *nach* TAK-TF sein. Zum anderen wäre dies möglicherweise auch ein Indiz für die durchflusszytometrisch gemessene Abnahme des CD62P der unstimulierten PLT *nach* TF im Vergleich zu den PLT *vor* TF am jeweiligen TF-Tag. Weiterhin spräche das ebenfalls für den inversen Verlauf der unstimulierten CD62P-positiv gemessenen Thrombozyten *vor* gegenüber *nach* TF, deren Prozentsatz zu Beginn der TAK Lagerung *vor* TF niedrig war, mit steigendem Alter jedoch anstieg und sich *nach* TF entsprechend umgekehrt verhielt. Weiterhin ergab die Untersuchung der mit TRAP-6 stimulierten PLT unabhängig vom TAK Alter durchschnittlich fast nur Maximalwerte (MW *vor* TF: 96,2%, *nach* TF: 97,8%) ohne Signifikanzunterschiede zwischen den Alterungstagen bzw. zwischen den TAK-PLT *vor* und *nach* TF am jeweils gleichen Tag. Dieser Prozentsatz

an stimulierten CD62P-positiven Thrombozyten nahm *vor* TF über die Lagerung nur geringfügig ab ( $p=0,056$ ) und war *nach* TF ebenfalls lagerungsunabhängig ( $p=0,626$ ). Signifikant bis teils hochsignifikant war allerdings die Differenz zwischen maximaler Stimulierbarkeit und der jeweiligen Voraktivierung der PLT *vor* TF, welche über die Lagerungszeit absank. Dies könnte ein Hinweis auf eine lagerungsabhängig verminderte relative Aktivierbarkeit als Maßstab für Funktions- und Lebensfähigkeit aller noch messbaren PLT sein, unabhängig wie groß deren absolute Anzahl ist. Kausal würde dies eher darauf hindeuten, dass vermehrt PLT *vor* TF mit zunehmender Lagerungszeit aktiviert und deren  $\alpha$ -Granulabestandteile in die PLT-Membran internalisiert wurden und weniger auf ein Absterben bzw. Fragmentierung der PLT mit Zunahme von freiwerdenden  $\alpha$ -Granula bzw.  $\alpha$ -Granulafragmenten im Plasma der TAK bei fortschreitendem TAK-Alter. Das würde erklären, warum der prozentuale Anteil des bestimmten CD62P der unstimulierten PLT *vor* TF mit dem Konservenalter zunahm und gleichzeitig kein signifikanter Abfall der gemessenen Thrombozytenzahlen über die Lagerungsdauer der TAK eruierbar war.

Eine zunehmende Aktivierung der TAK-PLT *vor* TF über die Lagerungszeit, gemessen an der steigenden CD62P Membraninternalisierung der unstimulierten PLT, führt zur konsekutiv zunehmenden Eliminierung der selben PLT *nach* TF (Rinder et al. 1991a), vorwiegend in der Milz und Leber (Fritze 2008, Remmele 1999), wie zum Beispiel durch Makrophagen (van den Berg et al. 2005). Somit würde der prozentuale Anteil aktivierter, unstimulierter PLT *nach* TF, also CD62P-positiver Thrombozyten, im Vergleich zu dem prozentualen Anteil aktivierter, unstimulierter PLT *vor* TF sinken, was mit unserer Untersuchung gezeigt werden konnte ( $p=0,004$ ). Das abgefallene Inkrement und die verminderte Recovery *nach* TF, in Abhängigkeit vom Alter der TAK-PLT unterstreichen diese Theorie ebenfalls (Arnold et al. 2006).

Der hohe AI frischer TAK-PLT *vor* und insbesondere *nach* TF (Tag 2) im Vergleich zu dem AI älterer Thrombozyten (Tag 4 und 5) könnte darauf hindeuten, dass noch vermehrt schnell aktivierbare und reaktive PLT in den frischen TAK *vor* TF vorhanden waren. Diese Theorie wird von der Tatsache gestützt, dass die Grund- oder Voraktivierung (unstimulierte CD62P Messwerte) der frischen PLT *vor* TF sehr niedrig war und erst *nach* TF anstieg. Man könnte schlussfolgern, dass diese PLT erst *nach* der TF aktiviert wurden und ihre volle Funktionsfähigkeit, gemessen am hohen AI aller transfundierten frischen PLT, beibehalten haben. Im Gegensatz zu den eher alten TAK-PLT: Deren AI war sowohl *vor* als auch *nach* TF signifikant bzw. sehr signifikant niedriger als derer frischer PLT *vor* bzw. *nach* TF. Weiterhin lag ihr prozentualer Anteil an unstimulierten CD62P-positiven PLT *vor* TF sehr signifikant höher als derer frischer PLT *vor* TF. Dies könnte einer alterungsabhängigen Voraktivierung im TAK entsprechen. Ihr prozentualer Anteil an unstimulierten CD62P-

positiven PLT *nach* TF fiel ab, was mit einem zunehmenden Abbau im RES der Leber und Milz erklärbar wäre (Guder und Nolte 2005, Baum 2004). Das niedrige CCI und die ebenfalls gesunkene Recovery am Tag 4/5 gegenüber dem Tag 2 der TAK-PLT *nach* TF weisen ebenfalls daraufhin. Und obwohl der AI am Tag 4/5 der TAK-PLT *nach* TF noch grenzwertig im Referenzbereich lag, deuten unsere eben geschilderten Ergebnisse darauf hin, dass die Menge an funktionsfähigen PLT in alten TAK extrem gering ist und somit das erwünschte Therapieziel der Wiederherstellung einer physiologischen Hämostase durch TF nicht erreicht werden kann. Geht man von der Theorie aus, dass es verschiedene Subpopulationen an PLT im Organismus gibt, eher junge, schnell reaktive und leicht aktivierbare, sowie ältere, trägere mit einer hohen Aktivierungsschwelle (Saving et al. 2002, Rinder et al. 1998) und das gleichzeitig das Mengenverhältnis dieser Populationen variiert, könnte man folgendes annehmen: Die Subpopulation leicht reaktiver Thrombozyten in den frischen TAK ist durchschnittlich noch wenig aktiviert, was dem niedrigen CD62P entspricht, aber adäquate Reaktionsreize, wie TRAP-6 oder der PADA, führen zur vollen Aktivierung (maximales CD62P nach Stimulation mit TRAP-6) (Bruhn et al. 2007, Hesse et al. 2001) bzw. Adhäsion (sehr hoher AI) der PLT *vor* als auch *nach* TF. Die niedrige Voraktivierung und die dadurch bedingte verminderte Eliminierung der PLT im RES des Empfängerorganismus könnte ergänzend ein Grund für das große CCI und die hohe Recovery frischer TAK sein, wodurch eine hinreichend große Anzahl funktionstüchtiger PLT für eine optimale Hämostase zur Verfügung steht.

Im Laufe des Alterungsprozesses der TAK-PLT steigt die Voraktivierung dieser eher schnell reaktiven und leicht aktivierbaren Thrombozytenpopulation vorzugsweise an, was man an dem steigenden P-Selektin erkennen kann (Ishiwata et al. 1997). Die Stimulation mit TRAP-6 *vor* TF führt trotzdem noch zu einem großen Prozentsatz CD62P-positiver PLT. Allerdings resultiert aus langer Lagerungszeit ein zunehmender Funktionsverlust (Shrivastava 2009), gemessen am sinkenden AI (Rummeler 2005). *Nach* TF alter TAK-PLT sank der prozentuale Anteil der unstimulierten CD62P-positiven Thrombozyten gegenüber selbiger *vor* TF massiv ab und die Thrombozytenfunktion blieb auch *nach* TF signifikant beeinträchtigt, was durch den niedrigen AI deutlich wurde. Dieser starke P-Selektinabfall ist mit einem gesteigerten Abbau im RES der Leber und Milz der bereits *vor* TF aktivierten, vermehrt schnell aktivierbaren und reaktiven Thrombozytenpopulation der TAK erklärbar. Konsekutiv würde diese Thrombozytenpopulation für die gewünschte hämostaseologische Wirksamkeit der TAK *nach* TF nicht mehr zur Verfügung stehen. Auch das lagerungs- und voraktivierungsabhängig abgefallene Inkrement dieser Messungen bzw. die niedrige Recovery könnte diese Theorie der verschiedenen Plättchenpopulationen erhärten. Gutensohn et al. 2002 zeigten hierzu, dass es bei erhöhtem P-Selektin vermehrt zu WBC–

PLT Interaktionen in vivo kommt, die vor allem bei den älteren TK mit hohem P-Selektin als Ursache für das erniedrigte CCI gesehen werden. Dies konnten Leytin et al. 2004 bestätigen, welche CD62P in Kaninchen für die schnell vermittelte TK Clearance verantwortlich machten. Vermutlich bleibt nur eine geringe Menge der transfundierten Thrombozyten übrig, die lediglich eine hohe Aktivierungsschwelle haben und folglich wenig reaktiv sind. In unserer Studie könnte sich dies in dem niedrigen AI sowie dem gesunkenen CCI und Recovery widerspiegeln.

Letztendlich würde das bedeuten, dass lediglich frische TAK-PLT über eine ausreichende hämostaseologische Funktionsfähigkeit verfügen (Rinder et al. 2003).

Zusätzlich ließ sich sonografisch bei allen Patienten unserer Untersuchung ein für dieses Erkrankungsbild typischer Hypersplenismus finden, welcher eigens zu einer verkleinerten Recovery aufgrund der größeren Speicherkapazität führt und additiv einen beschleunigten Abbau voraktivierter PLT fördert (Novotny 1999). Daher sollte besonders bei Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen auf eine TF mit frischen TK-PLT geachtet werden, zumal diese den Hauptanteil aller TF ausmachen. Alternativ müssten für eine adäquate Hämostase bei höherer Lagerungszeit entsprechend mehr TK-PLT transfundiert werden. Ist das allerdings gesundheitsökonomisch und vor allem ethisch vertretbar?

Würde man die Thrombozytenpopulationstheorie noch weiterführen und berücksichtigen, dass manche Menschen und damit potenzielle Thrombozytenspender über vorwiegend stark reaktive und leicht aktivierbare Thrombozyten verfügen (Rummler 2005), gemessen z.B. an einem sehr hohen AI, und andere dagegen eher trägere PLT mit einer hohen Stimulationsschwelle bilden, wäre es denkbar, eine gezielte thrombozytenaktivitäts-indikationsgesteuerte Spender-Empfänger-Politik zu betreiben. Zum Beispiel könnte für therapeutische Spenden eher ein hoher AI günstig sein, um verletztes Gewebe möglichst schnell zu versorgen (niedrige Aktivierungsschwelle). Für prophylaktische TF würden demnach eher PLT von Spendern mit einem AI im niedrigen bis mittleren Referenzbereich von Vorteil sein, da diese aufgrund der höheren Reaktionsschwelle nicht sofort verbraucht werden würden und eine konsekutiv längere Lebenszeit hätten. Hinweise hierfür gibt eine weitere Studie von Rinder et al. 2003, in der sie vorübergehende Metabolismusstörungen von Plättchen beschrieben, welche nach Wiederherstellung des physiologischen Milieus der Thrombozytensuspension vollkommen reversibel waren, wenn die PLT keine erhöhte Phosphatidylserinexpression aufwiesen. Wie die P-Selektinexpression stellt die Phosphatidylserinexpression einen Indikator für vermehrte Aktivierung dar (Sims und Wiedmer 2001, Tzima und Walker 2000, Dachary-Prigent et al. 1993). Durch die Expression von Phosphatidylserine werden die PLT analog zur P-Selektin-Expression für die Eliminierung durch Makrophagen zugänglich (Shapira et al. 2000, Zwaal und Schroit 1997).

Vorläufige Daten deuten darauf hin, dass solche „wiederhergestellten“ PLT eine normale Recovery bzw. CCI *nach* TF haben. Dies könnte bedeuten, dass PLT mit einer höheren Aktivierungsschwelle über eine bessere Restaurationsfähigkeit verfügen und sich demnach ändernden hämostaseologischen Bedingungen flexibler anpassen könnten. Allerdings ist eine verlängerte Überlebenszeit primär kein Garant für eine bessere Funktionsfähigkeit bzw. ist nicht mit ihr kongruent. Denn Thrombozyten mit einer sehr hohen Aktivierungsschwelle reagieren dementsprechend langsam bzw. benötigen adäquate starke Reaktionsreize. Dies führt natürlich zu einer entsprechend längeren Überlebenszeit.

Außer der spenderspezifischen Thrombozytenaktivität spielt auch die Herstellung der TK eine große Rolle. Denn entscheidende Merkmale einer erfolgreichen Plättchentherapie werden maßgeblich von den Präparationstechniken und der Lagerungsart dieser lebenssichernden Blutkomponente bestimmt (Shrivastava 2009). Einfluss sowohl auf die Wiederfindungs- als auch auf die Überlebensrate haben weiterhin die Lagerungsdauer der Konzentrate und die Art und Weise der Gewinnung (Dumont et al. 2006). Aktuell untersuchte eine hausinterne Studie (Straube 2010) die maschinenabhängige ACD-A-Zufuhr während der Plättchenentnahme der Thrombozytenspende zur Gerinnungshemmung. Sie konnte zeigen, dass deren Volumen-Fließgeschwindigkeitsverhältnis (Volumen/Zeit) ganz maßgeblich die Adhäsivität (AI) der gewonnen PLT beeinflusst und es hierbei weniger auf die Gesamtmenge an ACD-A ankommt. Außerdem scheinen die Thrombozytenzahl und die Calciumionen der Spender eine entscheidende Rolle zu spielen, da hiervon natürlich die PLT-Calciumionen-Citrat Relation abhängt. Je mehr und je schneller das ACD-A gleich zu Beginn der Entnahme die Thrombozyten im Spendeschlauchsystem erreichte, desto niedriger war der AI nach Abnahme und desto höher erwies sich der AI am Ende der Lagerung der TAK. Nach Zusatz von RBC und zweistündiger Inkubation war er am Ende des Lagerungszeitraums noch größer: Citrat cheliert die für die Thrombozytenfunktion essentiellen Calciumionen und bewirkt dadurch einen „Dornröschenschlaf“-ähnlichen Zustand der Thrombozyten im TAK. Denn die Aktivierung von PLT wird verhindert und es bilden sich weniger Mikroaggregate (Stiegler et al. 2002, Mody et al. 1999, Phillips et al. 1997). Dieser „thrombozytäre Ruhezustand“ würde auch die Aktivierung der PLT selbst durch modernste Verfahren der Blutplättchengewinnung mittels Zellseparation mindern. Denn plötzliche Scherstressänderungen, zwei mal höher als im vaskulären System (durch Pumpen des Vollblutes, Zentrifugation und unvermeidbaren Fremdoberflächenkontakt) führen zur Aktivierung der PLT (Jung et al. 1995, Kawakami et al. 1993). Ein schnelles Erreichen dieses „thrombozytären Ruhezustandes“ scheint ein wirksamer Schutz vor Plättchenfunktionsschäden, beispielsweise durch Präparationstechnik, Lagerungsdauer etc., zu sein, und umso effektiver wäre die Restauration der PLT *nach* TF durch



Wiederherstellung des physiologischen Milieus (Tzima und Walker 2000), was durch den Zusatz von RBC und die Inkubation in unserer Studie gezeigt wurde. Diese Restauration kann weiterhin durch die bereits beschriebene Anhebung des Hämatokrits gesteigert werden. Eine Citratanwesenheit führt zusammengefasst zu einer gewollten, aber potenziell reversiblen Hypofunktionalität der PLT im TAK und verhindert möglicherweise Alterungsprozesse während der Lagerung (Althaus 2006). Daraus würde eine bessere Qualität der PLT resultieren. Unklar bleibt allerdings, wie viel ACD-A zugegeben werden sollte. Denn eine zu geringe ACD-A Dosierung führt zu einem höheren Calciumspiegel im TAK und belässt die PLT in einer stärkeren Reaktivität, was der entsprechend größere AI zeigte. Umgekehrt verhält sich eine zu hohe ACD-A-Zugabe: Praktisch alles Calcium wäre gebunden, was einen lebensnotwendigen Grundstoffwechsel der PLT blockieren und eine vollständige Deaktivierung nach sich ziehen würde. Unweigerlich käme es zu dem bereits beschriebenen programmierten Zelltod ähnlichen Finalstadium der Thrombozyten im TAK. Nach bisherigem Wissensstand wäre daher eine individuelle ACD-A Zugabe bei Entnahme in Abhängigkeit von Thrombozytenzahl und Calciumionenspiegel der Spender indiziert. Für die Validierung der optimalen Citratdosis sollte aus diesen Gründen adäquat weiter geforscht werden. Einen Anhaltspunkt hierfür gibt eine weitere bereits erwähnte Studie unseres Institutes: die hämatokritabhängige Adhäsivität (AI) von PLT (Rummler 2005). Ihre Ergebnisse legen eine Restaurationsfähigkeit von Thrombozyten nahe und könnten für die Optimierung der Präparationstechnik genutzt werden.

Im Kontext ist festzuhalten, dass alternde TAK-PLT eine höhere Voraktivierung als frische Thrombozyten zeigen und ihre relative Stimulierbarkeit reduziert ist. Die gesteigerte PLT-Aktivierung und der konsekutive Funktionsverlust steigern zudem die in vivo Eliminierung *nach* TAK-TF. Zusätzlich könnten auch die Entnahmeverfahren zur Gewinnung von TAK-PLT letztendlich die verminderte klinische Wirksamkeit alter TAK im Vergleich zu jüngeren erklären. Nichtzuletzt erschweren klinische Probleme, wie ein Hypersplenismus, die Wirksamkeit und Effizienz von TAK-TF.

## 7 Schlussfolgerungen

Mit unserer Arbeit konnte, zusätzlich zur Messung der Funktion von TAK-PLT *vor* TF, erstmalig die Funktion derselben Thrombozyten *nach* TF an Patienten in Aplasie gezeigt werden. Mit zunehmender Lagerungsdauer nimmt die Anzahl der noch zur Adhäsion fähigen PLT sowohl *vor* als auch *nach* TF stark ab. Weiterhin fallen mit zunehmender Lagerungsdauer der TAK das CCI und die Recovery *nach* TF ab, währenddessen die Voraktivierung (CD62P) der PLT *vor* TF im Vergleich zu den PLT *nach* TF invers ansteigt.

Um einen ausreichenden hämostatischen Effekt *nach* TF zu erzielen, sollten nur frische oder minimal gelagerte PLT übertragen werden. Die TF von gelagerten TAK-PLT sollte entsprechend der ermittelten Ergebnisse nur bis Tag 3 erfolgen. Da für eine bestmögliche Funktionsbeurteilung allein die Quantitätsbestimmungen (CCI, Recovery) *nach* TF nicht ausreichend erscheinen, sondern besonders die Qualität von Bedeutung ist, empfiehlt es sich Funktionstests, wie den PADA, für das Qualitätsmanagement zu integrieren. Ferner sollte ein physiologischer Hämatokrit *vor* der TF von PLT, zum Beispiel durch TF eines EK, sichergestellt sein.

Des Weiteren scheinen nicht alle Thrombozytenspender für eine PLT-Entnahme geeignet. Denn PLT sind in Suspensionen heterogen und setzen sich aus unterschiedlichen Subpopulationen zusammen. In nachfolgenden Studien sollte dies fortführend untersucht werden. Richtungsweisend würde sich eine AI-abhängige Auswahl der Thrombozytenspender für die jeweilige Transfusionsindikation empfehlen.

Die Citratantikoagulation der TAK ist seit Jahren unverändert und bedarf einer Überarbeitung. Eine der Adhäsivität der Spenderplättchen angepasste Antikoagulation kann möglicherweise die Qualität und somit Funktionalität der zu transfundierenden PLT positiv beeinflussen.

Summa summarum konnten die bereits seit langem veröffentlichten lagerungsabhängigen Thrombozytenfunktionsstörungen vieler *in vitro* Studien (= *vor* TF) nun auch *ex vivo* (= *nach* TF) mittels des PADA bestätigt werden. Aus diesem Grunde sollten die bis dato vom PEI geforderten Qualitätskriterien für die Herstellung und Anwendung von TAK-PLT neu überdacht und zusätzlich *ex vivo* Funktionsuntersuchungen gefordert werden. Dies ist mit dem PADA als einfaches zu handhabendes und standardisierbares Verfahren realisierbar. Er kann leicht routinemäßig zur Qualitätskontrolle von PLT *vor* und *nach* TF eingesetzt werden. Mit ihm lässt sich objektiv die aktuelle Plättchenadhäsivität beurteilen. Somit kann er einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung der TF von Thrombozyten leisten.

## 8 Literatur und Quellenverzeichnis

### 8.1 Publikationen anderer Autoren

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé 2003. Transfusion de plaquettes: produits, indications.
- Änderungen und Ergänzungen 2008. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) aufgestellt gemäß Transfusionsgesetz von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut; Gesamtnovelle 2005; mit Änderungen und Ergänzungen 2007. Aufl. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Consensus Conference 1987. Platelet Transfusion Therapy JAMA 257: 1777-1780.
- Council of Europe Publishers 2007. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components recommendaton No. R (95) 15. 13. ed.te Aufl. Strasbourg: Council of Europe Publ.
- Dtsch Ärztebl 1997. Prognosefaktor nach Herzinfarkt. Deutsches Ärzteblatt, (94(9): A-510 / B-430 / C-405)
- Leitlinien der Bundesärztekammer 2003. Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten hrsg. von: Vorstand u. Wiss. Beirat d. Bundesärztekammer. 3., überarb. und erw. Aufl.te Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl.
- Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer 2008. Querschnitts-Leitlinien der Bundesärztekammer zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 4. Auflage te Aufl. Deutscher Ärzte-Verlag; Auflage: 4., überarbeitete Auflage. (14. November 2008).
- Richtlinien der Bundesärztekammer 2006. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) aufgestellt gemäß Transfusionsgesetz von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut; Gesamtnovelle 2005; mit 15 Tabellen [Mitglieder des Redaktionskomitees: G. Bein]. Aufl. Köln: Dt. Ärzte-Verl.
- Agha IA, Rueda J, Alvarez A, Singer GG, Miller BW, Flavin K, Lowell JA, Shenoy S, Howard TK, Ramachandran V, Irish W, Schnitzle MA, Brennan DC. 2002. Short course induction immunosuppression with thymoglobulin for renal transplant recipients. Transplantation, 73 (3):473-475.
- Ali MH, Schumacker PT. 2002. Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor? Crit Care Med, 30 (5 Suppl):S198-206.
- Alkhamis TM, Beissinger RL, Chediak JR. 1990. Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow. Blood, 75 (7):1568-1575.
- Althaus. 2006. Untersuchungen von Blutplättchen in frischen und gelagerten Pool-Präparaten mit dem Platelet ADhesion Assay (PADA) im Vergleich zu Apherese-Präparaten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller Universität.:
- Anderson GH, Hellums JD, Moake J, Alfrey CP, Jr. 1978. Platelet response to shear stress: changes in serotonin uptake, serotonin release, and ADP induced aggregation. Thromb Res, 13 (6):1039-1047.
- Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, Koller B, Phillips DR, Conley PB. 2003. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. J Clin Invest, 112 (3):398-406.
- Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. 1997. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. Int J Biochem Cell Biol, 29 (1):91-105.
- Arnold DM, Heddle NM, Kulczycky M, Carruthers J, Sigouin C, Blajchman MA. 2006. In vivo recovery and survival of apheresis and whole blood-derived platelets: a paired comparison in healthy volunteers. Transfusion, 46 (2):257-264.

- Aster RH. 1966. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. *J Clin Invest*, 45 (5):645-657.
- AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Murphy S. 2004. Preliminary validation of a new standard of efficacy for stored platelets. *Transfusion*, 44 (1):36-41.
- Bacigalupo A, Broccia G, Corda G, Arcese W, Carotenuto M, Gallamini A, Locatelli F, Mori PG, Saracco P, Todeschini G, et al. 1995. Antilymphocyte globulin, cyclosporin, and granulocyte colony-stimulating factor in patients with acquired severe aplastic anemia (SAA): a pilot study of the EBMT SAA Working Party. *Blood*, 85 (5):1348-1353.
- Baum U. 2004. Anatomie und Physiologie Weiße Reihe Bd. 1. 7. Aufl. te Aufl. Elsevier.
- Baynes RD, Lamparelli RD, Bezwoda WR, Gear AJ, Chetty N, Atkinson P. 1988. Platelet parameters. Part II. Platelet volume-number relationships in various normal and disease states. *S Afr Med J*, 73 (1):39-43.
- Beiras-Fernandez A, Walther S, Thein E, Muenzing S, Hammer C. 2005. Influence of polyclonal ATGs on expression of adhesion molecules: an experimental study. *Transplant Proc*, 37 (4):1944-1946.
- Belval T, Hellums JD, Solis RT. 1984. The kinetics of platelet aggregation induced by fluid-shearing stress. *Microvasc Res*, 28 (3):279-288.
- Bertolini F, Murphy S. 1996. A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion*, 36 (2):128-132.
- Bessman JD, Williams LJ, Gilmer PR, Jr. 1981. Mean platelet volume. The inverse relation of platelet size and count in normal subjects, and an artifact of other particles. *Am J Clin Pathol*, 76 (3):289-293.
- Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, et al. 1991. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*, 67 (2):233.
- Blajchman MA. 2003. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *J Thromb Haemost*, 1 (7):1637-1641.
- Bock M, Gawaz MP, Dietzler A, Heim MU, Mempel W. 1994. Single-donor platelet concentrates: changes of surface glycoproteins during storage. *Haemostasis*, 24 (4):230-235.
- Bock M, Rahrig S, Kunz D, Lutze G, Heim MU. 2002. Platelet concentrates derived from buffy coat and apheresis: biochemical and functional differences. *Transfus Med*, 12 (5):317-324.
- Bock M, Glaser A, Pfosser A, Schleuning M, Heim MU, Mempel W. 1993. Storage of single-donor platelet concentrates: metabolic and functional changes. *Transfusion*, 33 (4):311-315.
- Bode AP. 1990. Platelet activation may explain the storage lesion in platelet concentrates. *Blood Cells*, 16 (1):109-125; discussion 125-106.
- Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ. 1991. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood*, 77 (4):887-895.
- Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. 1996. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant*, 15 (5):435-442.
- Bonnefoy A, Liu Q, Legrand C, Frojmovic MM. 2000. Efficiency of platelet adhesion to fibrinogen depends on both cell activation and flow. *Biophys J*, 78 (6):2834-2843.
- Boomgaard MN, Gouwerok CW, Homburg CH, de Groot G, MJ II, de Korte D. 1994. The platelet adhesion capacity to subendothelial matrix and collagen in a flow model during storage of platelet concentrates for 7 days. *Thromb Haemost*, 72 (4):611-616.
- British Committee for Standards in Haematology BTTF. 2003. Guidelines for the use of platelet transfusions.[see comment]. *British Journal of Haematology*, 122 (1):10-23.
- Bruhn, Schambeck, Hach-Wunderle. 2007. Hämostaseologie für die Praxis: Sicher durch den klinischen Alltag. 1. Auflage te Aufl. Schattauer.

- Byzova TV, Plow EF. 1998. Activation of alphaVbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol*, 143 (7):2081-2092.
- Callow CR, Swindell R, Randall W, Chopra R. 2002. The frequency of bleeding complications in patients with haematological malignancy following the introduction of a stringent prophylactic platelet transfusion policy. *Br J Haematol*, 118 (2):677-682.
- Cardigan R, Williamson LM. 2003. The quality of platelets after storage for 7 days. *Transfus Med*, 13 (4):173-187.
- Cetin M, Eser B, Er O, Unal A, Kilic E, Patirolu T, Coskun HS, Altinbas M, Arslan D, Ilhan O. 2001. Effects of DMSO on platelet functions and P-selectin expression during storage. *Transfus Apher Sci*, 24 (3):261-267.
- Chakroun T, Abdelkefi S, Bouslama M, Houissa B, Zaier M, Miled A, Kortas M, Yacoub S. 2008. [Platelet-leukocyte aggregates as a marker for platelet activation in platelet concentrates]. *Transfus Clin Biol*, 15 (4):148-153.
- Chawla AS, Hinberg I. 1991. Leaching of plasticizers from and surface characterization of PVC blood platelet bags. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, 19 (4):761-783.
- Clemetson K, Scharf R. 1999. Bernard-Soulier-Syndrom. In: Müller-Berghaus G, Hrsg. *Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Aufl. Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Singapur Tokio: Springer, 53-56.
- Clemetson KJ. 1999. Primary haemostasis: sticky fingers cement the relationship. *Curr Biol*, 9 (3):R110-112.
- Clemetson KJ, Clemetson JM. 1995. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost*, 21 (2):130-136.
- Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Acquart S, Chavarin P, Courbil R, Fabrigli P, Garraud O. 2009. Donor platelets stored for at least 3 days can elicit activation marker expression by the recipient's blood mononuclear cells: an in vitro study. *Transfusion*, 49 (1):91-98.
- Coller B. 1991. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: Fozzard HA, Hrsg. *The Heart and cardiovascular system : scientific foundations*. 2ndte Aufl. New York: Raven Press, 219-273.
- Coller B. 2001. Hereditary qualitative platelet disorders. In: Beutler E, Williams WJ, Hrsg. *Williams hematology*. 6thte Aufl. New York ; London: McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 1551-1582.
- Coller BS. 1990. Platelets and thrombolytic therapy. *N Engl J Med*, 322 (1):33-42.
- Coller BS. 1992. Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Annu Rev Med*, 43:171-180.
- Coller BS. 1997. GPIIb/IIIa antagonists: pathophysiologic and therapeutic insights from studies of c7E3 Fab. *Thromb Haemost*, 78 (1):730-735.
- Corash L. 2003. How much do we know about the platelet transfusion threshold? *Transfusion*, 43 (6):691-693.
- Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT. 1993. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood*, 81 (10):2554-2565.
- Dalgaard J, Floisand Y, Stenersen M, Egeland T, Brinch L. 2007. [Non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 127 (6):721-724.
- de Groot PG, Sixma JJ. 1990. Platelet adhesion. *Br J Haematol*, 75 (3):308-312.
- de Wildt-Eggen J, Gulliksson H. 2003. In vivo and in vitro comparison of platelets stored in either synthetic media or plasma. *Vox Sang*, 84 (4):256-264.
- Deitenbeck R, Scharf RE. 1998. Veränderungen thrombozytärer Membranglykoproteine bei Herstellung und Lagerung von Thrombozytenpräparaten. *LaboratoriumsMedizin / Journal of Laboratory Medicine*, Band 22, (Heft 3.):Seiten 143–154.

- Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH. 1996. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science*, 273 (5272):252-255.
- Djaldetti M, Fishman P, Bessler H, Chaimoff C. 1979. pH-induced platelet ultrastructural alterations. A possible mechanism for impaired platelet aggregation. *Archives of Surgery*, 114 (6):707-710.
- Dubey S, Srivastava A, Nityanand S. 2002. Induction of apoptosis of peripheral blood mononuclear cells by antithymocyte globulin (ATG) in aplastic anemia: an in vivo and in vitro study. *Ann Hematol*, 81 (5):249-253.
- Dumont LJ, AuBuchon JP, Gulliksson H, Slichter SJ, Elfath MD, Holme S, Murphy JR, Rose LE, Popovsky MA, Murphy S. 2006. In vitro pH effects on in vivo recovery and survival of platelets: an analysis by the BEST Collaborative. *Transfusion*, 46 (8):1300-1305.
- Eriksson L, Kristensen J, Olsson K, Bring J, Hogman CF. 1996. Evaluation of platelet function using the in vitro bleeding time and corrected count increment of transfused platelets. Comparison between platelet concentrates derived from pooled buffy coats and apheresis. *Vox Sang*, 70 (2):69-75.
- Facquet-Danis J, Scarabin PY, Dumoulin-Lagrange M, Ravoisier N, Samama M. 1982. [Measurement of platelet volume: methodologic approach and application in diabetes]. *Nouv Rev Fr Hematol*, 24 (2):69-73.
- Faraday N, Goldschmidt-Clermont P, Dise K, Bray PF. 1994. Quantitation of soluble fibrinogen binding to platelets by fluorescence-activated flow cytometry. *J Lab Clin Med*, 123 (5):728-740.
- Fijnheer R, Modderman PW, Veldman H, Ouwehand WH, Nieuwenhuis HK, Roos D, de Korte D. 1990. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. Changes during platelet storage. *Transfusion*, 30 (1):20-25.
- Fitzgerald DJ. 2001. Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion. *Neurology*, 57 (5 Suppl 2):S1-4.
- Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. 2006. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol*, 4 (6):445-457.
- Fitzgerald LaP, DR. 1987. Platelet membrane glycoproteins. In: Colman RW, Hrsg. Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice 2ndte Aufl. Philadelphia [u.a.]: Lippincott, 572-593
- Fontano S. 2007. Thrombozytentransfusion. Pipette : Swiss laboratory medicine (Schweizerische Union für Laboratoriumsmedizin): offizielles Publikationsorgan der SULM/USML, Schweizerische Union für Laboratoriumsmedizin:6-11.
- Frickhofen N, Rosenfeld SJ. 2000. Immunosuppressive treatment of aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporine. *Semin Hematol*, 37 (1):56-68.
- Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H. 2003. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. *Blood*, 101 (4):1236-1242.
- Frickhofen N, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H, Raghavachar A, Vogt HG, Herrmann F, Freund M, Meusers P, Salama A, Heimpel H. 1991. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporine. The German Aplastic Anemia Study Group. *N Engl J Med*, 324 (19):1297-1304.
- Fritze J. 2008. Die ärztliche Begutachtung. 7. Auflte Aufl. Springer.
- Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. 2001. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*, 86 (1):214-221.
- Gachet C. 2001. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost*, 86 (1):222-232.
- Gawaz M. 1999. Das Blutplättchen : Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Aufl. Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag.

- Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. 1999. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation*, 99 (1):E1-E11.
- Gawaz MP. 2001. Blood platelets physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet drugs, coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease; 47 tables Meinrad Gawaz. [Translation of the German ed.: R. E. Dunmur]. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. 1991. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest*, 88 (4):1128-1134.
- Gear AR. 1994. Platelet adhesion, shape change, and aggregation: rapid initiation and signal transduction events. *Can J Physiol Pharmacol*, 72 (3):285-294.
- Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. 1998. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood*, 91 (7):2360-2368.
- Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*, 343 (6260):757-760.
- George JN. 1992. Changes in platelet membrane glycoproteins during blood bank storage. *Blood Cells*, 18 (3):501-511; discussion 512-505.
- George JN, Shattil SJ. 1991. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med*, 324 (1):27-39.
- Giles C. 1981. The platelet count and mean platelet volume. *Br J Haematol*, 48 (1):31-37.
- Ginsberg MH, Du X, O'Toole TE, Loftus JC. 1995. Platelet integrins. *Thromb Haemost*, 74 (1):352-359.
- Goldsmith HL, McIntosh FA, Frojmovic MM. 1998. The kinetics of thrombin- and SFLLRN-induced aggregation of human platelets in flow through tubes. *Biorheology*, 35 (1):53-68.
- Goldsmith HL, Bell DN, Braovac S, Steinberg A, McIntosh F. 1995. Physical and chemical effects of red cells in the shear-induced aggregation of human platelets. *Biophys J*, 69 (4):1584-1595.
- Goodall AH. 1991. Platelet activation during preparation and storage of concentrates: detection by flow cytometry. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2 (2):377-382.
- Guder WG, Nolte J. 2005. Das Laborbuch für Klinik und Praxis. Aufl. Elsevier.
- Gutensohn K, Geidel K, Brockmann M, Siemens M, Krueger W, Kroeger N, Kuehn P. 2002. Binding of activated platelets to WBCs in vivo after transfusion. *Transfusion*, 42 (10):1373-1380.
- Guttmann RD, Caudrelier P, Alberici G, Touraine JL. 1997. Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving thymoglobuline and immunosuppression. *Transplant Proc*, 29 (7A):24S-26S.
- Hakim RM, Schafer AI. 1985. Hemodialysis-associated platelet activation and thrombocytopenia. *Am J Med*, 78 (4):575-580.
- Hakim RM, Lazarus JM. 1988. Biochemical parameters in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*, 11 (3):238-247.
- Hamburger SA, McEver RP. 1990. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*, 75 (3):550-554.
- Hanson SR, Slichter SJ. 1985. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood*, 66 (5):1105-1109.
- Harker LA, Finch CA. 1969. Thrombokinesis in man. *J Clin Invest*, 48 (6):963-974.
- Harris K, Nguyen P, Van Cott EM. 2008. Platelet PIA2 Polymorphism and the risk for thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*, 129 (2):282-286.
- Hartley PS. 2007. Platelet senescence and death. *Clin Lab*, 53 (3-4):157-166.

- Hassett A. 2002. Platelet function testing. *Transfus Med Update*, Issue #5.
- Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. 1989. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem*, 264 (14):7768-7771.
- Heal JM, Blumberg N. 2004. Optimizing platelet transfusion therapy. *Blood Rev*, 18 (3):149-165.
- Heckman KD, Weiner GJ, Davis CS, Strauss RG, Jones MP, Burns CP. 1997. Randomized study of prophylactic platelet transfusion threshold during induction therapy for adult acute leukemia: 10,000/microL versus 20,000/microL. *J Clin Oncol*, 15 (3):1143-1149.
- Helg C, Roux E, Beris P, Cabrol C, Wacker P, Darbellay R, Wyss M, Jeannet M, Chapuis B, Roosnek E. 1993. Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT. *Bone Marrow Transplant*, 12 (2):125-129.
- Hertenstein B, Wiesneth M, Novotny J, Bunjes D, Stefanic M, Heinze B, Hubner G, Heimpel H, Arnold R. 1993. Interferon-alpha and donor buffy coat transfusions for treatment of relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*, 56 (5):1114-1118.
- Hesse J, Doll M, Wilhelm M, Seitz R, Heiden M. 2001. Beurteilung der Thrombozytenfunktion in Zulassungsunterlagen. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 28 (1):44-50.
- Hoffbrand AV. 1997. Roche Grundkurs Hämatologie mit 113 Tabellen A. V. Hoffbrand; J. E. Pettit; D. Hoelzer. Unter Mitarb. von Nicola Gökbüget. [Aus dem Engl. von Katharina Look]. Aufl. Berlin Wien [u.a.]: Blackwell-Wiss.-Verl.
- Holme S, Moroff G, Murphy S. 1998. A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion*, 38 (1):31-40.
- Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, Elfath MD. 1997. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion*, 37 (1):12-17.
- Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. 1984. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem*, 259 (14):9121-9126.
- Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I, et al. 1991. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest*, 87 (4):1234-1240.
- Ishiwata S, Takeda T, Nakanishi S, Nishiyama S, Seki A. 1997. Postangioplasty restenosis: platelet activation and the coagulation-fibrinolysis system as possible factors in the pathogenesis of restenosis. *Am Heart J*, 133 (4):387-392.
- Jacobsohn DA, Vogelsang GB. 2007. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis*, 2:35.
- Jung F, Blasi U, Radtke H, Mrowietz C, Pindur G, Kiesewetter H, Wenzel E. 1995. Plateletpheresis-induced increase in platelet reactivity using different cell separators. *Infusionsther Transfusionsmed*, 22 (4):237-243.
- Jurk AS, H. Van Aken, A. Janning, V. Gerke, Kehrel BE. 2005. Crosstalk between Haemostasis and Inflammation: Platelets modulate the Adhesion and Transmigration process of Monocytes. In: International Anesthesia Research Society 79th Clinical and Scientific Congress. Honolulu, Hawaii, March 11-15, 2005, Abstracts. *Anesthesia & Analgesia*, 100:S-59.
- Jurk K, Kehrel B. 2008. Thrombozytensekretion. In: B M-BGuP, Hrsg. Hämostaseologie. 2. Ausgabe Aufl. Heidelberg: Springer Verlag, In press,
- Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, Van Aken H, Kehrel BE. 2003. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at



- high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J*, 17 (11):1490-1492.
- Kaplan K. 1994. *Laboratory Markers of Platelet Activation*. Third Editionte Aufl. Philadelphia (U.S.A.): Lippincott:
- Kawakami K, Harada Y, Sakasita M, Nagai H, Handa M, Ikeda Y. 1993. A new method for continuous measurement of platelet adhesion under flow conditions. *ASAIO J*, 39 (3):M558-560.
- Kehrel B. 1995. Platelet-collagen interactions. *Semin Thromb Hemost*, 21 (2):123-129.
- Kehrel BE. 2003. [Blood platelets: biochemistry and physiology]. *Hamostaseologie*, 23 (4):149-158.
- Kluter H, Dorges L, Maass E, Wagner T, Bartels H, Kirchner H. 1996. In-vivo evaluation of random donor platelet concentrates from pooled buffy coats. *Ann Hematol*, 73 (2):85-89.
- Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*, 76 (12):2462-2465.
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*, 86 (5):2041-2050.
- Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. 1996. Platelets and shear stress. *Blood*, 88 (5):1525-1541.
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. 2000. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*, 105 (6):783-791.
- Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. 1989. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*, 59 (2):305-312.
- Lehner JT, Van Peteghem PK, Leatherman KD, Brink MA. 1981. Experience with an intraoperative autogenous blood recovery system in scoliosis and spinal surgery. *Spine (Phila Pa 1976)*, 6 (2):131-133.
- Levesque MJ, Nerem RM. 1989. The study of rheological effects on vascular endothelial cells in culture. *Biorheology*, 26 (2):345-357.
- Levin J, Bessman JD. 1983. The inverse relation between platelet volume and platelet number. Abnormalities in hematologic disease and evidence that platelet size does not correlate with platelet age. *J Lab Clin Med*, 101 (2):295-307.
- Leytin V, Freedman J. 2003. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus Apher Sci*, 28 (3):285-295.
- Leytin V, Allen DJ, Gwozdz A, Garvey B, Freedman J. 2004. Role of platelet surface glycoprotein Ibalpha and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates. *Transfusion*, 44 (10):1487-1495.
- Lippi U, Cappelletti P. 1984. Mean platelet volumes and platelet counts in hospitalized patients. *Am J Clin Pathol*, 81 (3):406-407.
- Lozano ML, Rivera J, Gonzalez-Conejero R, Moraleda JM, Vicente V. 1997. Loss of high-affinity thrombin receptors during platelet concentrate storage impairs the reactivity of platelets to thrombin. *Transfusion*, 37 (4):368-375.
- Manfredi AA, Rovere-Querini P, Maugeri N. 2009. Dangerous connections: neutrophils and the phagocytic clearance of activated platelets. *Curr Opin Hematol*, 17 (1):3-8.
- Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. 2004. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *J Thromb Haemost*, 2 (6):969-977.
- Marguerie GA, Edgington TS, Plow EF. 1980. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor as part of a multistep reaction in ADP-induced platelet aggregation. *J Biol Chem*, 255 (1):154-161.

- Marks R, Finke J. 2006. [The impact of stem cell therapy in hematology and oncology]. *Internist (Berl)*, 47 (5):467-468, 470-468.
- McEver RP, Martin MN. 1984. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem*, 259 (15):9799-9804.
- Metzelaar MJ, Korteweg J, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. 1993. Comparison of platelet membrane markers for the detection of platelet activation in vitro and during platelet storage and cardiopulmonary bypass surgery. *J Lab Clin Med*, 121 (4):579-587.
- Mody M, Lazarus AH, Semple JW, Freedman J. 1999. Preanalytical requirements for flow cytometric evaluation of platelet activation: choice of anticoagulant. *Transfus Med*, 9 (2):147-154.
- Moog R, Muller N. 1999. White cell reduction during plateletpheresis: a comparison of three blood cell separators. *Transfusion*, 39 (6):572-577.
- Morgenstern E. 1997. Platelets morphology/ ultrastructure. In: Bruchhausen Fv, Walter U, Hrsg. *Platelets and their factors*. Aufl. Berlin ; London: Springer, 27-52.
- Morgenstern E, Kehrel B, Matzdorff A. 2001. How do platelets aggregate? 45th Meeting of the GTH, 17. 2. 2001 Düsseldorf. *Annals of hematology*, 80:A48.
- Moroff G, Holme S. 1991. Concepts about current conditions for the preparation and storage of platelets. *Transfus Med Rev*, 5 (1):48-59.
- Moroff G, Luban NL. 1997. The irradiation of blood and blood components to prevent graft-versus-host disease: technical issues and guidelines. *Transfus Med Rev*, 11 (1):15-26.
- Moroi M, Jung SM. 1998. Integrin-mediated platelet adhesion. *Front Biosci*, 3:d719-728.
- Muller C, Schernthaner G, Kovarik J, Kalinowska W, Zielinski CC. 1987. Natural killer cell activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients under various immunosuppressive regimens. *Clin Immunol Immunopathol*, 44 (1):12-19.
- Murata M, Fukuyama M, Satoh K, Fujimura Y, Yoshioka A, Takahashi H, Handa M, Kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y. 1993. Low shear stress can initiate von Willebrand factor-dependent platelet aggregation in patients with type IIB and platelet-type von Willebrand disease. *J Clin Invest*, 92 (3):1555-1558.
- Murphy S. 1997. Platelet function, kinetics, and metabolism: Impact on quality, assessment, storage, and clinical use. In: McLeod BC, Price TH, MJ D, Hrsg. *Apheresis principles and practice* Aufl. Bethesda, Md.: AABB Press, 123-139.
- Murphy S. 2004. Radiolabeling of PLTs to assess viability: a proposal for a standard. *Transfusion*, 44 (1):131-133.
- Nagai H, Handa M, Kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y. 1993. Evidence that plasma fibrinogen and platelet membrane GPIIb-IIIa are involved in the adhesion of platelets to an artificial surface exposed to plasma. *Thromb Res*, 71 (6):467-477.
- Nicwiarowski S, Holt J, Cook J. 1994. *Biochemistry and physiology of secreted platelet proteins*. Third Editionte Aufl. Philadelphia (U.S.A.): Lippincott:
- Niewiarowski S, Kornecki E, Budzynski AZ, Morinelli TA, Tuszynski GP. 1983. Fibrinogen interaction with platelet receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 408:536-555.
- Norfolk DR, Ancliffe PJ, Contreras M, Hunt BJ, Machin SJ, Murphy WG, Williamson LM. 1998. Consensus Conference on Platelet Transfusion, Royal College of Physicians of Edinburgh, 27-28 November 1997. Synopsis of background papers. *Br J Haematol*, 101 (4):609-617.
- Novotny VM. 1999. Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sang*, 76 (1):1-13.
- Nurden A. 1994. Human platelet glycoproteins. In: Bloom AL, Hrsg. *Haemostasis and thrombosis*. 3rdte Aufl. Edinburgh: Churchill Livingstone, 259-285
- Nurden A, George J. 2006. Inherited Abnormalities of the Platelet Membrane: Glanzmann Thrombasthenia, Bernard Soulier Syndrome, and Other Disorders. In: Colman RW, Hrsg. *Hemostasis and thrombosis : basic principles and clinical practicum*. 5thte Aufl. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins,
- Nurden AT. 2006. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis*, 1:10.

- Nurden AT, Nurden P. 2001. Inherited defects of platelet function. *Rev Clin Exp Hematol*, 5 (4):314-334; quiz following 431.
- Offermanns S. 2006. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 99 (12):1293-1304.
- Osende JJ, Fuster V, Lev EI, Shimbo D, Rauch U, Marmur JD, Richard M, Varon D, Badimon JJ. 2001. Testing platelet activation with a shear-dependent platelet function test versus aggregation-based tests: relevance for monitoring long-term glycoprotein IIb/IIIa inhibition. *Circulation*, 103 (11):1488-1491.
- Paquette RL. 2002. Diagnosis and management of aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Oncology (Williston Park)*, 16 (9 Suppl 10):153-161.
- Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, Zanobini M, Sala A, Steffan A, Ruggeri ZM. 2000. Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis. *Circulation*, 102 (11):1290-1295.
- Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. 2005. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*, 115 (12):3348-3354.
- Peerschke EI. 1985. The platelet fibrinogen receptor. *Semin Hematol*, 22 (4):241-259.
- Perrotta PL, Perrotta CL, Snyder EL. 2003. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion*, 43 (4):526-535.
- Phillips DR, Law D, Scarborough RM. 1998. Glycoprotein IIb-IIIa in platelet aggregation: an emerging target for the prevention of acute coronary thrombotic occlusions. *Arch Pathol Lab Med*, 122 (9):811-812.
- Phillips DR, Fitzgerald LA, Charo IF, Parise LV. 1987. The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. Structure, function, and relationship to adhesive protein receptors in nucleated cells. *Ann N Y Acad Sci*, 509:177-187.
- Phillips DR, Teng W, Arfsten A, Nannizzi-Alaimo L, White MM, Longhurst C, Shattil SJ, Randolph A, Jakubowski JA, Jennings LK, Scarborough RM. 1997. Effect of Ca<sup>2+</sup> on GP IIb-IIIa interactions with integrilin: enhanced GP IIb-IIIa binding and inhibition of platelet aggregation by reductions in the concentration of ionized calcium in plasma anticoagulated with citrate. *Circulation*, 96 (5):1488-1494.
- Pitchford SC, Momi S, Giannini S, Casali L, Spina D, Page CP, Gresele P. 2005. Platelet P-selectin is required for pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment in a murine model of allergic inflammation. *Blood*, 105 (5):2074-2081.
- Pizzulli L, Yang A, Martin JF, Luderitz B. 1998. Changes in platelet size and count in unstable angina compared to stable angina or non-cardiac chest pain. *Eur Heart J*, 19 (1):80-84.
- Plow EF, Ginsberg MH. 1989. Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog Hemost Thromb*, 9:117-156.
- Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. 1992. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost*, 18 (3):324-332.
- Porter DL, Roth MS, McGarigle C, Ferrara JL, Antin JH. 1994. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 330 (2):100-106.
- Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM. 1994. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation*, 57 (5):685-694.
- Rebulla P, Finazzi G, Marangoni F, Avvisati G, Gugliotta L, Tognoni G, Barbui T, Mandelli F, Sirchia G. 1997. The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukemia. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto. *N Engl J Med*, 337 (26):1870-1875.
- Reesink HW, Engelfriet CP, Tegtmeier GE, O'Riordan J, Eglin R, Barbara JA, Flanagan P, Lin CK, Rawlinson W, Muylle L, Wendel S, Biagini S, Lazar AE, Krusius T, Alitupa E, Grillner L, Preiser W, Doerr HW, Brand A, Zupanska B, Brojer E, Degre M. 2002. Prevention of post-transfusion cytomegalovirus: leucoreduction or screening? *Vox Sang*, 83 (1):72-87.

- Remmele W. 1999. Pathologie 1. 2. Auflage te Aufl. Springer.
- Rinder HM. 1998. Platelet function testing by flow cytometry. Clin Lab Sci, 11 (6):365-372.
- Rinder HM, Snyder EL. 1992. Activation of platelet concentrate during preparation and storage. Blood Cells, 18 (3):445-456; discussion 457-460.
- Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. 1991a. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. Blood, 78 (7):1760-1769.
- Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, Stocks J, Ault KA, Hillman RS. 1991b. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. Transfusion, 31 (5):409-414.
- Rinder HM, Snyder EL, Bonan JL, Napychank PA, Malkus H, Smith BR. 1993. Activation in stored platelet concentrates: correlation between membrane expression of P-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and beta-thromboglobulin release. Transfusion, 33 (1):25-29.
- Rinder HM, Tracey JB, Recht M, DeCastro L, Rinder CS, McHugh C, Smith BR. 1998. Differences in platelet alpha-granule release between normals and immune thrombocytopenic patients and between young and old platelets. Thromb Haemost, 80 (3):457-462.
- Rinder HM, Snyder EL, Tracey JB, Dincecco D, Wang C, Baril L, Rinder CS, Smith BR. 2003. Reversibility of severe metabolic stress in stored platelets after in vitro plasma rescue or in vivo transfusion: restoration of secretory function and maintenance of platelet survival. Transfusion, 43 (9):1230-1237.
- Robertson MJ, Ritz J. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood, 76 (12):2421-2438.
- Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. 1999. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. J Exp Med, 190 (6):803-814.
- Rosado JA, Meijer EM, Hamulyak K, Novakova I, Heemskerk JW, Sage SO. 2001. Fibrinogen binding to the integrin alpha(IIb)beta(3) modulates store-mediated calcium entry in human platelets. Blood, 97 (9):2648-2656.
- Rosenfeld BA, Herfel B, Faraday N, Fuller A, Braine H. 1995a. Effects of storage time on quantitative and qualitative platelet function after transfusion. Anesthesiology, 83 (6):1167-1172.
- Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D, Young NS. 1995b. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. Blood, 85 (11):3058-3065.
- Rothwell SW, Maglasang P, Krishnamurti C. 1998. Survival of fresh human platelets in a rabbit model as traced by flow cytometry. Transfusion, 38 (6):550-556.
- Ruggeri ZM. 1993. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. Thromb Haemost, 70 (1):119-123.
- Ruggeri ZM. 1994. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. Semin Hematol, 31 (3):229-239.
- Rummler. 2005. Messung der Adhäsivität von frischen und gelagerten Blutplättchen in Thrombozytapheresekonzentraten mit dem „platelet adhesion assay“ PADA., [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller Universität.:
- Ryu GH, Kim J, Ruggeri ZM, Han SH, Kim JH, Min BG. 1995. Effect of shear stress on fibrinogen adsorption and its conformational change. ASAIO J, 41 (3):M384-388.
- Saving KL, Mankin PE, Gorman MJ. 2002. Differences in adhesion receptor expression between immature and older platelets and red blood cells of neonates and adults. J Pediatr Hematol Oncol, 24 (2):120-124.
- Scharf R. 1996. Molecular basis and clinical aspects of hereditary megakaryocyte and platelet membrane glycoprotein disorders. Hämostaseologie 16:114-138.
- Scharf R, Hoffmann T, Zotz R. 1999. Moderne Konzepte zur Hämotherapie. In: RE S, Hrsg. Transfusionsmedizin, Hämotherapie, Hämostaseologie. Aufl. Duisburg: Basis 132-139.

- Scharf RE. 2003a. [Congenital and acquired thrombocytopenias]. *Hamostaseologie*, 23 (4):159-169.
- Scharf RE. 2003b. [Congenital and acquired platelet function disorders]. *Hamostaseologie*, 23 (4):170-180.
- Scharf RE, Hanfland P. 1993. Platelet storage lesions: analysis of platelet membrane glycoproteins and platelet-derived microparticles by fluorescence-activated flow cytometry. *Transfus Sci*, 14 (2):189-194.
- Scharf RE, Giers G. 1998. [Treatment with blood components and coagulation factor concentrates--modern concepts of hemotherapy]. *Praxis (Bern 1994)*, 87 (36):1148-1152.
- Schumann A, Wiesenburg A, Bucha E, Nowak G. 2004. [Platelet Adhesion Assay (PADA), a new quantitative test for assessment of platelet function and therapeutic drug monitoring of GPIIb/IIIa and ADP receptor antagonists]. *Hamostaseologie*, 24 (3):211-216.
- Seghatchian J, Krailadsiri P. 1997. The platelet storage lesion. *Transfus Med Rev*, 11 (2):130-144.
- Shapira S, Friedman Z, Shapiro H, Presseizen K, Radnay J, Ellis MH. 2000. The effect of storage on the expression of platelet membrane phosphatidylserine and the subsequent impact on the coagulant function of stored platelets. *Transfusion*, 40 (10):1257-1263.
- Shattil SJ. 2005. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. *Trends Cell Biol*, 15 (8):399-403.
- Shattil SJ, Brass LF. 1985. The interaction of extracellular calcium with the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Nouv Rev Fr Hematol*, 27 (4):211-217.
- Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. 1987. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, 70 (1):307-315.
- Shrivastava M. 2009. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci*, 41 (2):105-113.
- Shulman NR JJ. 1987. Platelet Kinetics. In: Hrsg. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Aufl. Lippincott, Philadelphia London St Louis Sao Paulo Sydney: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ et al., 431-451.
- Siess W. 1989. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev*, 69 (1):58-178.
- Sims PJ, Wiedmer T. 2001. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost*, 86 (1):266-275.
- Singer SJ, Nicolson GL. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 (23):720-731.
- Singh H, Chaudhary R, Ray V. 2003. Evaluation of platelet storage lesions in platelet concentrates stored for seven days. *Indian J Med Res*, 118:243-246.
- Sixma J. 1994. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom AL, Hrsg. Hemostasis and thrombosis. 3rdte Aufl. Edinburgh: Churchill Livingstone, 259-285.
- Sloand EM, Yu M, Klein HG. 1996. Comparison of random-donor platelet concentrates prepared from whole blood units and platelets prepared from single-donor apheresis collections. *Transfusion*, 36 (11-12):955-959.
- Smith AG, O'Reilly RJ, Hansen JA, Martin PJ. 1985. Specific antibody-blocking activities in antilymphocyte globulin as correlates of efficacy for the treatment of aplastic anemia. *Blood*, 66 (3):721-723.
- Snyder EL. 1992. Activation during preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion*, 32 (6):500-502.
- Stanworth SJ, Hyde C, Heddle N, Rebulla P, Brunskill S, Murphy MF. 2004. Prophylactic platelet transfusion for haemorrhage after chemotherapy and stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*, (4):CD004269.
- Stefanini L, Roden RC, Bergmeier W. 2009. CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation. *Blood*, 114 (12):2506-2514.

- Stephan B, Dobonici M, Schenk J, Seyfert U. 2004. Quality of platelet concentrates at the end of storage time. Hamburg: Schattauer.
- Stiegler G, Eichelberger B, Leitner G, Jilma B, Hoecker P, Panzer S. 2002. Response to vWF-coated beads and soluble p-selectin to characterize apheresis platelets: a comparison of three cell separators. *Transfusion*, 42 (3):375-379.
- Straube. 2010. Untersuchungen der Blutplättchen von Apherese-Spendern mit dem "Platelet Adhesion Assay (PADA)". Jena: Friedrich-Schiller Universität.:
- Teramura M, Kobayashi S, Iwabe K, Yoshinaga K, Mizoguchi H. 1997. Mechanism of action of antithymocyte globulin in the treatment of aplastic anaemia: in vitro evidence for the presence of immunosuppressive mechanism. *British Journal of Haematology*, 96 (1):80-84.
- Theilmeier G, Lenaerts T, Remacle C, Collen D, Vermeylen J, Hoylaerts MF. 1999. Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoid/endothelial cell interaction under shear stress. *Blood*, 94 (8):2725-2734.
- Tokime K, Isoda K, Yamanaka K, Mizutani H. 2000. A case of acute graft-versus-host disease following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Dermatol*, 27 (7):446-449.
- Tomasulo P, Lenex B, Hrsg. 1984. Platelet Transfusion Therapy. Aufl. Arlington: American Association of Blood Banks.
- Tomer A, Scharf RE, McMillan R, Ruggeri ZM, Harker LA. 1994. Bernard-Soulier syndrome: quantitative characterization of megakaryocytes and platelets by flow cytometric and platelet kinetic measurements. *European Journal of Haematology*, 52 (4):193-200.
- Triulzi DJ, Kickler TS, Braine HG. 1992. Detection and significance of alpha granule membrane protein 140 expression on platelets collected by apheresis. *Transfusion*, 32 (6):529-533.
- Tsai WB, Grunkemeier JM, McFarland CD, Horbett TA. 2002. Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *J Biomed Mater Res*, 60 (3):348-359.
- Tynngard N, Lindahl TL, Trinks M, Studer M, Berlin G. 2008. The quality of platelet concentrates produced by COBE Spectra and Trima Accel cell separators during storage for 7 days as assessed by in vitro methods. *Transfusion*, 48 (4):715-722.
- Tzima E, Walker JH. 2000. Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets*, 11 (5):245-251.
- U.S. FaDA. FDA Guidance 1999. Guidance for Industry For Platelet Testing and Evaluation of Platelet Substitute Products. Aufl. [Rockville, Md.]: U.S. Food and Drug Administration, Dept. of Health and Human Services.
- Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. 1995. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*, 269 (6 Pt 1):C1371-1378.
- van den Berg F, Gifford L, Jan Cabri L. 2005. 2. Auflte Aufl. Thieme.
- van Rhee F, Lin F, Cullis JO, Spencer A, Cross NC, Chase A, Garicochea B, Bungey J, Barrett J, Goldman JM. 1994. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood*, 83 (11):3377-3383.
- von Hundelshausen P, Weber C. 2007. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*, 100 (1):27-40.
- Wandt H, Ehninger G, Gallmeier WM. 2001. New strategies for prophylactic platelet transfusion in patients with hematologic diseases. *Oncologist*, 6 (5):446-450.
- Wandt H, Frank M, Ehninger G, Schneider C, Brack N, Daoud A, Fackler-Schwalbe I, Fischer J, Gackle R, Geer T, Harms P, Löffler B, Ohl S, Otremba B, Raab M, Schonrock-Nabulsi P, Strobel G, Winter R, Link H. 1998. Safety and cost effectiveness of a 10 x 10<sup>9</sup>/L trigger for prophylactic platelet transfusions

- compared with the traditional 20 x 10<sup>9</sup>/L trigger: a prospective comparative trial in 105 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 91 (10):3601-3606.
- Wang C, Mody M, Herst R, Sher G, Freedman J. 1999. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. *Transfus Sci*, 20 (2):129-139.
- Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. 1992. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem*, 267 (23):16637-16643.
- Weiss HJ. 1995. Flow-related platelet deposition on subendothelium. *Thromb Haemost*, 74 (1):117-122.
- Weyrich AS, Lindemann S, Tolley ND, Kraiss LW, Dixon DA, Mahoney TM, Prescott SP, McIntyre TM, Zimmerman GA. 2004. Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Semin Thromb Hemost*, 30 (4):491-498.
- Zentrales-Knochenmarkspender-Register-Deutschland ZKRD Zentrales Knochenmarkspender-Register für die Bundesrepublik Deutschland gemeinnützige GmbH [www.zkrd.de](http://www.zkrd.de); <http://www.zkrd.de/spenderzahlen.html>.
- Zumberg MS, del Rosario ML, Nejame CF, Pollock BH, Garzarella L, Kao KJ, Lottenberg R, Wingard JR. 2002. A prospective randomized trial of prophylactic platelet transfusion and bleeding incidence in hematopoietic stem cell transplant recipients: 10,000/L versus 20,000/microL trigger. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8 (10):569-576.
- Zwaal RF, Schroit AJ. 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89 (4):1121-1132.

## 8.2 Eigene Publikation/Abstract

Groh, Matthias, Rummeler, S., Barz, D., 2010, A new function test to assure the quality of transfused platelets (PLT) for platelet concentrates from apheresis (A-TC), *Blood Products - 3.1 Blood Processing, Storage and Release*, University Hospital Jena /Institute of Transfusion Medicine, Jena, Germany, Der Abstract wurde zum International Congress of the ISBT 2010 eingereicht, angenommen und am 30. Juni 2010 als Poster vorgestellt.

## **9 Anhang**

### **9.1 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Barz und Frau Dr. Rummler für die Überlassung des Themas. Ihre unermüdliche intensive Begleitung und Beratung während der aufwendigen PLT-Analysen und der Erstellung des Manuskriptes sowie Ihre Begeisterung für das Thema, Ihre Geduld und Ihr schier unermüdlicher Enthusiasmus haben in einem ganz erheblichen Maß zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dankbar bin ich ferner für die Hilfe von Herrn Prof. Nowak, der mit seinem Fachwissen durch Rat und Tat der gesamten Arbeit zur Seite stand.

Auch möchte ich Frau Dr. Hoyer und Herrn Dr. Vollandt danken. Ohne Sie wäre die äußerst aufwendige Durchführung der statistischen Auswertung nicht möglich gewesen. Sie trugen durch Ihre intensive und kritische Diskussion zu zentralen Fragen der Arbeit bei.

Herrn PD Dr. Sayer, Leiter des Institutes für PBSZT und KMT an der FSU Jena, und seinem ganzen Stationsteam möchte ich für Ihre Hilfe und Ihrem zeitlichen Engagement bei der Durchführung unserer Studie danken. Ganz besonders bedanken möchte ich bei allen Patienten, welche sich trotz Ihrer Krankheit und deren Folgen für unsere Untersuchungen nicht selbstverständlich zur Verfügung stellten.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie und allen Freunden die die lange Arbeit während der Datenanalyse und der Auswertung für diese Dissertation wohlwollend unterstützen.



## 9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Frau Prof. Dr. med. Barz

Frau Dr. med. Rummler

Herr Prof. Dr. med. Nowak

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 20. Dezember 2010

Matthias Groh

### 9.3 Lebenslauf

Name: Matthias Groh

Geburtsdatum: 06. März 1982

Geburtsort: Zwickau

Familienstand: ledig

Schulbesuch: 09/1988 – 08/1990 Friedrich-Schiller-Oberschule, Zwickau  
09/1990 – 08/1993 Fucikschule, Zwickau  
09/1993 – 01/1996 Clara-Wieck-Gymnasium, Zwickau  
01/1996 – 07/2000 Gerhart-Hauptmann-Gymnasium, Zwickau  
07/2000 Abitur

Dienst: 08/2000 – 07/2001 Zivildienst an der Paracelsusklinik Zwickau

Ausbildung: 10/2001 – 07/2009 Studium der Humanmedizin an der  
Friedrich-Schiller-Universität in Jena

Berufliche Tätigkeit: 09/2009 – 01/01/2010 Assistenzarzt am Institut für  
Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums der Friedrich-  
Schiller-Universität Jena  
  
Seit 02/2010 Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Kinder-  
und Jugendpsychiatrie und –psychotherapie des  
Universitätsklinikums der Carl-Gustav-Carus-Universität  
Dresden